UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 N° 91

# FIBRINOFORMATION ET FIBRINOLYSE
# CONTRIBUTION A L'ETUDE CINETIQUE

## THÈSE
### POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en juin 1970

par

Annick PANAK

Membres du jury ...

MM. J. MONNIER — Président

L. DOUSTE-BLAZY
P. MONTASTRUC
R. BIERME — Assesseurs

G. ESPAGNO — Suppléant

Imprimée au C.E.I.P.
1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0042

# FIBRINOFORMATION ET FIBRINOLYSE
# CONTRIBUTION A L'ETUDE CINETIQUE

UNIVERSITE
de
TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

# TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen : Monsieur LAZORTHES

Assesseur (Médecine) : Monsieur MONNIER

Assesseur (Pharmacie) : Monsieur BREUILLAUD

Doyens honoraires : MM. GORSE, CALVET, BRUSTIER

Professeurs honoraires : MM. VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BUGNARD, VINCENT, MOREL, BOUISSET, CALMETTES, THOMAS, LAGROT, DULUCQ.

## SECTION MEDECINE

| | |
|---|---|
| Clinique médicale et cardiologique | MM. MERIEL |
| Clinique médicale sud | GADRAT |
| Clinique chirurgicale | FICAT |
| Clinique chirurgicale et gynécologique | FABRE Pierre |
| Clinique chirurgicale et du cancer | GRIMOUD |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie | PASQUIE |
| Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique | RIEUNAU |
| Clinique de chirurgie cardio-vasculaire | ENJALBERT |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques | BAZEX |
| Clinique des maladies des voies urinaires | LHEZ |
| Clinique des maladies infectieuses | N.... |
| Clinique médicale infantile et puériculture | SOREL |
| Clinique médicale de la première enfance | BARDIER |
| Clinique de neuro-chirurgie | LAZORTHES |
| Clinique neurologique et psychiatrique | GERAUD |
| Clinique obstétricale | PONTONNIER |
| Clinique odonto-stomatologique | CADENAT |
| Clinique ophtalmologique | N.... |
| Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale | CALVET |
| Clinique de pneumo-phtisiologie | DELAUDE |
| Clinique rhumatologique | RUFFIE René |
| Accouchement et obstétricie sociale | JAHIER |
| Anatomie | BASTIDE |
| Anatomie appliquée | POULHES |
| Anatomie pathologique | FABRE Jacques |
| Anesthésie et réanimation | LARENG |
| Bactériologie et virologie | Mme ENJALBERT |
| Biophysique médicale A | M. AUVERGNAT |

UNIV. LEIDEN BIBL.

| | |
|---|---|
| Biophysique médicale B | MM. BRU |
| Chimie biologique | VALDIGUIE Paul |
| Electro-radiologie | MARQUES |
| Embryologie générale | BROUSSY Jean |
| Hématologie | RUFFIE Jacques |
| Histologie | BIMES |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie | DARNAUD |
| Hygiène et médecine sociale | MONNIER |
| Immunologie | DUCOS |
| Médecine légale et médecine du travail | PLANQUES |
| Pathologie chirurgicale | DAMBRIN |
| Pathologie générale et médecine expérimentale | SENDRAIL |
| Pathologie médicale | RIBAUT |
| Physiologie | LAPORTE Yves |
| Physiologie appliquée et pharmacologie | BAISSET |
| Sémiologie et clinique médicale | LAPORTE Jacques |
| Thérapeutique | DARDENNE |

## - PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL -

| | |
|---|---|
| Histologie et embryologie | MM. GUILHEM |
| Anatomie pathologique | BOUISSOU |
| Biochimie médicale | DOUSTE-BLAZY |
| Histologie et embryologie | PLANEL |
| Maladies infectieuses | ARMENGAUD |
| Oto-rhino-laryngologie | CLAUX |
| Pathologie médicale | BOULARD |
| Physiologie | MONTASTRUC |
| Physiologie | BESSOU |
| Physique médicale | COMMANAY |
| Pneumo-phtisiologie | MIGUERES |

## - PROFESSEURS SANS CHAIRE -

| | |
|---|---|
| Anatomie pathologique | M. FABRE Jean |
| Bactériologie, parasitologie, virologie | Mme LARENG |
| Biochimie médicale | MM. VALDIGUIE Pierre |
| Chirurgie générale | GEDEON |
| Chirurgie générale | SARRAZIN |
| Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire | ESCHAPASSE |
| Electro-radiologie | PONS |
| Electro-radiologie | ROULLEAU |
| Médecine générale et thérapeutique | BOLLINELLI |
| Ophtalmologie | DEODATI |
| Pédiatrie | DALOUS |
| Neuro-chirurgie | ESPAGNO Jacques |
| Médecine générale et thérapeutique | SUC |
| Pédiatrie | REGNIER |
| Médecine générale | RIBET |

## - MAITRES DE CONFERENCES AGREGES -

| | |
|---|---|
| Carcinologie | MM. ESTRADE |
| Médecine générale et thérapeutique | BES |
| Pathologie expérimentale | GLEIZES |
| Médecine générale | ARLET Jacques |
| Thérapeutique, réanimation médicale, rééducation fonctionnelle et hydrologie | SALVADOR M. |
| Radiologie | COMBES Pierre |
| Pneumo-phtisiologie | ALBAREDE J.L. |
| Pédiatrie génétique médicale | ROCHICCIOLI P. |
| Chirurgie générale | ESCAT Jean |
| | COSTAGLIOLA |
| Orthopédie, traumatologie, chirurgie plastique et reconstructive | UTHEZA Guy |
| Urologie | PONTONNIER F. |
| Histologie, embryologie, cytogénétique | SOLEILHAVOUP J.P. |
| Biophysique | GUIRAUD Robert |
| Physiologie | PAGES Bernard |
| Parasitologie | LARROUY |
| Immunologie, hématologie, maladies du sang | BIERME Robert |
| Anatomie et organogénèse | JUSKIEWENSKI S. |

## - A G R E G E S -

| | |
|---|---|
| Médecine générale | MM. CALAZEL |
| Médecine générale | RASCOL |
| Médecine générale | LE TALLEC |
| Chirurgie générale | GAUBERT |
| Dermato et syphiligraphie | DUPRE |
| Hydrologie | DENARD |
| Médecine légale | GREZES-RUEFF |
| Neurologie et psychiatrie | GAYRAL |
| Obstétrique | ESPAGNO Guy |
| Ophtalmologie | BEC |

## - AGREGES LIBRES -

| | |
|---|---|
| Chirurgie générale | MM. SOUQUET |
| Pathologie chirurgicale | DIEULAFE |

## - MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE -

| | |
|---|---|
| Psychiatrie | M. LABOUCARIE |

## SECTION PHARMACIE

| | |
|---|---|
| Botanique et crytpogamie | N... |
| Chimie analytique | M. PITET |

| | |
|---|---|
| Toxicologie, hygiène industrielle et hydrologie | MM. BOURBON |
| Chimie pharmaceutique | BLANC |
| Microbiologie | BREUILLAUD |
| Pharmacie chimique et pharmacodynamie | CAUJOLLE |
| Pharmacie galénique et matière médicale | STANISLAS |
| Physiologie, zoologie et parasitologie pharmaceutique | ROUX |

## - PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL -

| | |
|---|---|
| Pharmacie | M. COUTURIER |
| Sciences naturelles | Mme CAUJOLLE |
| Toxicologie | M. BROUSSY G. |

## - PROFESSEURS SANS CHAIRE -

| | |
|---|---|
| Chimie organique | MM. BERTRAND |
| Zoologie | GAYREL |

## - MAITRES DE CONFERENCES AGREGES -

| | |
|---|---|
| Botanique | Mme LASCOMBES |
| Microbiologie | MM. MICHEL G. |
| Pharmacodynamie | CROS Jean |
| Physiologie | DUMAS J.C. |
| Pharmacie galénique | ROUFFIAC R. |
| Chimie biologique | SOULA G. |
| Toxicologie | MALBOSC R. |

## - PERSONNEL ADMINISTRATIF -

Secrétaire Principal : Monsieur J. ROCHE

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (délibération en date du 12 mai 1891)

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 N° 91

# FIBRINOFORMATION ET FIBRINOLYSE
# CONTRIBUTION A L'ETUDE CINETIQUE

## THÈSE
### POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en juin 1970

par

Annick PANAK

Membres du jury . . .

| | |
|---|---|
| MM. J. MONNIER | Président |
| L. DOUSTE-BLAZY | |
| P. MONTASTRUC | Assesseurs |
| R. BIERME | |
| G. ESPAGNO | Suppléant |

Imprimée au C.E.I.P.
1970

A MON MARI

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. MONNIER

*Professeur d'Hygiène*
*et de Médecine Sociale*

*Médecin des Hôpitaux*

Vous avez été pour nous un maître bienveillant tant à la Faculté qu'à l'Hôpital, où nous avons pu apprécier la clarté et la précision de votre enseignement, et votre présidence est pour nous un très grand honneur.

Soyez assuré de notre respectueuse reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur L. DOUSTE-BLAZY

*Professeur à la Faculté*

Nous avons toujours apprécié la clarté de votre enseignement.

Vous nous faites l'honneur de bien vouloir siéger à notre thèse. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur P. MONTASTRUC

*Professeur à la Faculté*

Vous nous avez fait découvrir la physiologie au travers d'un enseignement passionnant.

Permettez-nous de vous remercier et de vous exprimer notre respect.

Monsieur le Professeur R. BIERME

*Maître de Conférences Agrégé d'Hématologie*

Nous savons l'intérêt que vous portez à notre travail, comme en témoigne votre présence à ce jury.

Soyez assuré de notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur G. ESPAGNO

*Professeur Agrégé d'Obstétrique*

Vous avez toujours été pour nous un maître bienveillant.

Nous vous exprimons notre reconnaissance pour avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

A NOS MAITRES

*des Hôpitaux et de la Faculté de Médecine de Toulouse*

A Monsieur le Docteur J. DAVER

*Médecin Biologiste du Centre Hospitalier de Castres*

*Directeur du Poste de Transfusion Sanguine*

qui nous a si aimablement accueillie au Laboratoire de Biologie de Castres.

Nous tenons à lui exprimer nos vifs remerciements pour l'aide active et les précieux conseils qu'il a su nous prodiguer.

A Monsieur le Docteur A. CASTAIGNE

*Directeur du CENTRE D'ETUDES POUR L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE (C. E. I. P.)*

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

*AU CENTRE D'ETUDES POUR*
*L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE (C. E. I. P.)*

et particulièrement à tous ceux
qui nous ont aidée à réaliser ce travail.

# P L A N

FIBRINOFORMATION

Historique
Fibrinogène
Transformation du fibrinogène en fibrine

FIBRINOLYSE

Historique
Facteurs de la fibrinolyse
Dynamique du système fibrinolytique

ETUDE CINETIQUE

Méthodes d'étude de la fibrinolyse
Modèle mathématique
Application du modèle cinétique à la fibrinoformation

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

# INTRODUCTION

A l'occasion d'un travail sur la mesure des inhibiteurs de la fibrinolyse, nous avons été amenée à nous pencher sur la cinétique des réactions enzymatiques qui entrent en jeu dans ce processus. A la suite de l'étude mathématique que nous avons faite, nous avons élaboré une formulation qui tient compte des différents paramètres physiologiques et cette approche a été guidée par l'hypothèse d'une symétrie totale entre les processus de coagulation et de fibrinolyse. Cette symétrie, évoquée par la "balance hémostatique" d'ASTRUP (12), se retrouve dans le schéma de KOLLER (73) :

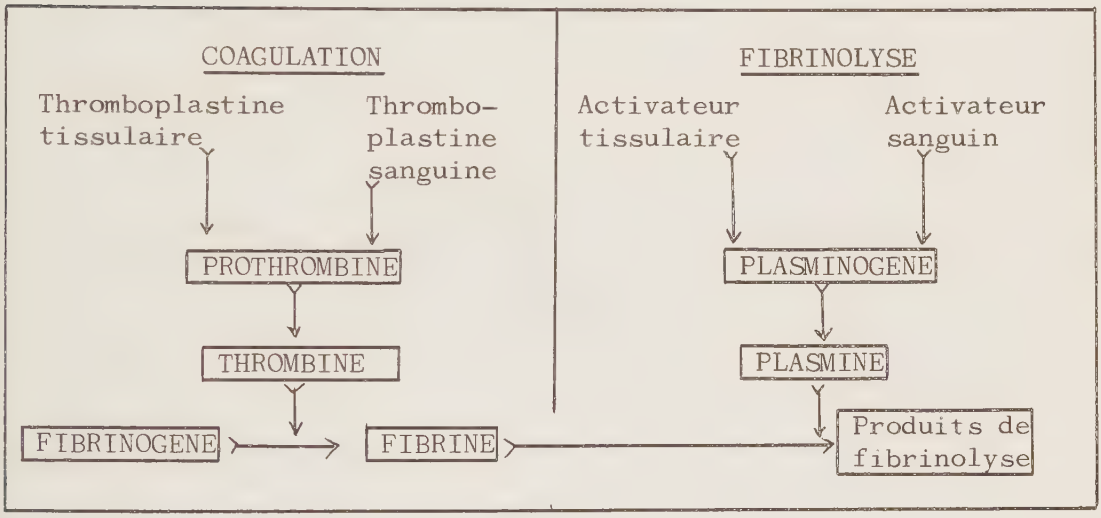



Figure 1

SCHEMA DE KOLLER

Si ce schéma montre une symétrie, au moins formelle, entre les mécanismes de coagulation et de lyse, les théories actuelles n'en sont généralement pas le reflet explicite.

En nous fondant sur nos faits expérimentaux, nous avons élaboré une théorie mathématique de la fibrinolyse qui est en faveur d'une telle symétrie. Après un rappel physiologique de la fibrinoformation et de la fibrinolyse, nous exposerons cette théorie mathématique de la cinétique qui nous amène à proposer une nouvelle méthode de dosage des inhibiteurs.

# C H A P I T R E  I

## FIBRINOFORMATION

# HISTORIQUE

Le phénomène de prise en masse du sang était connu depuis l'antiquité ; ARISTOTE avait décrit la nature "fibreuse" du sang coagulé, mais il a fallu attendre la seconde moitié du XIXème siècle pour que les expérimentateurs recherchent les mécanismes et les facteurs de ce changement de phase.

BUCHANAN, en 1845, observe que l'eau de lavage de caillots frais permet de coaguler un liquide d'ascite. En 1859, DENIS travaillant sur du plasma, isole, par précipitation au NaCl, un élément qui coagule spontanément et que VIRCHOW, en 1847, avait nommé fibrinogène. Le plasma, privé de cette substance, perd la propriété de coaguler. SCHMIDT, en 1862, reproduit l'expérience de BUCHANAN avec le sérum exprimé d'un caillot et conclut que le sérum frais contient une substance, qu'il appelle thrombine, douée d'une activité coagulante ; SCHMIDT peut l'extraire du sérum, mais non du plasma, et avance l'hypothèse suivant laquelle la thrombine se forme, au moment de la coagulation, à partir d'un précurseur plasmatique (que PEKELHARING nommera la prothrombine).

En 1890, ARTHUS et PAGES mettent en évidence le rôle du calcium en montrant que le sang décalcifié peut se conserver liquide à volonté et cette découverte constitue une aide précieuse pour les expérimentateurs qui établissent, peu après, que le calcium permet la conversion de la prothrombine en thrombine par les extraits tissulaires.

C'est alors, en 1904, que MORAWITZ peut avancer sa théorie de la coagulation : "les extraits tissulaires (thromboplastines) ont la propriété, en présence de calcium, de convertir la prothrombine du plasma en thrombine qui transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble".

Cette théorie s'est affinée, après 1945, avec la mise en évidence de la double origine des thromboplastines et l'identification des divers facteurs du complexe prothrombinique qui nous permettent de dresser un schéma d'ensemble de la coagulation (figure 2).

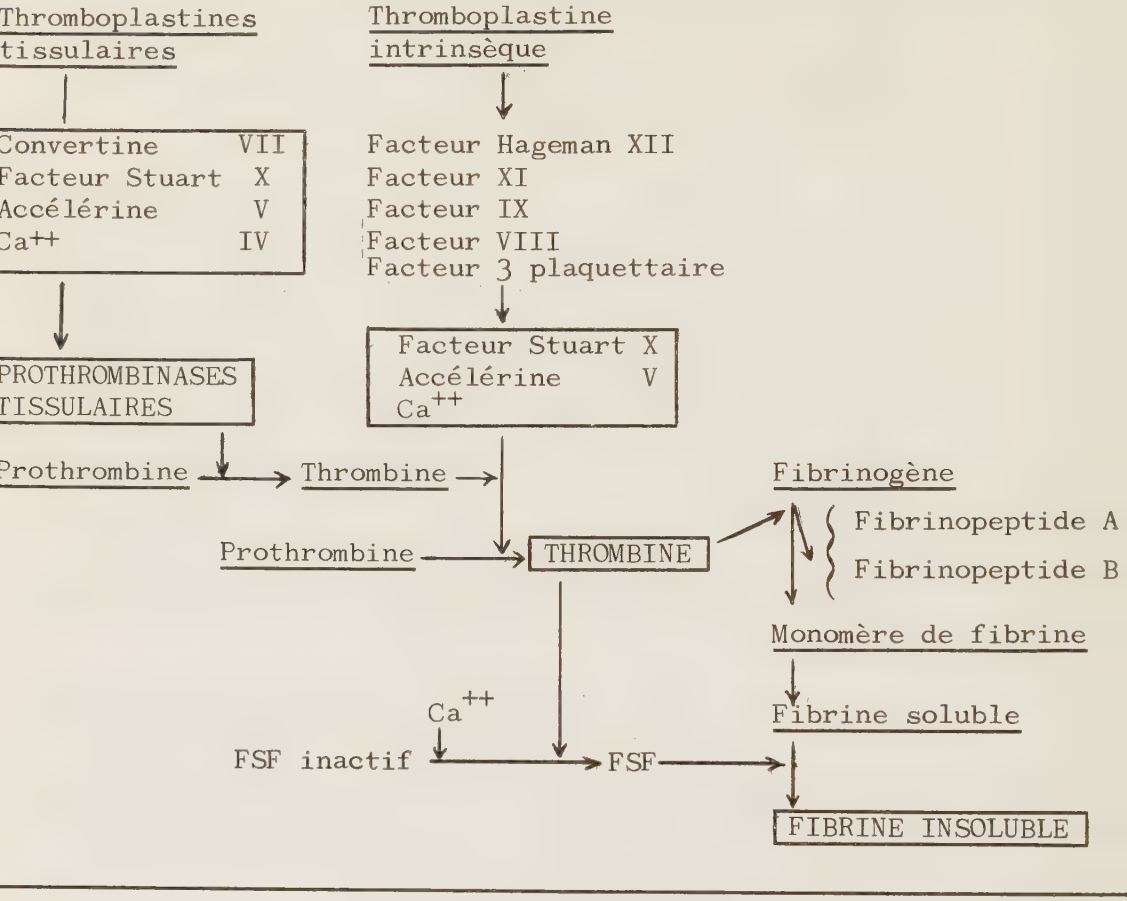



Figure 2

FIBRINOFORMATION

# FIBRINOGENE

Le fibrinogène, substrat de la fibrinoformation a été découvert par VIRCHOW en 1847 et son existence a été confirmée, en 1859, par DENIS puis par HAMMARSTEN qui ont réussi à l'isoler.

## ORIGINE ET LOCALISATION

TOCANTINS a montré que le fibrinogène était principalement élaboré par le foie. Cette synthèse a lieu au niveau des cellules parenchymateuses, comme l'ont mis en évidence BARNHART et ses collaborateurs (1962) par immunofluorescence : ils indiquent que la localisation de la fluorescence s'observe d'abord au niveau des ribosomes, puis dans la partie soluble de la cellule parenchymateuse, mais jamais au niveau des cellules de Küpffer.

La perfusion du foie par la lysine marquée confirme cette synthèse, tout comme les expériences d'hépatectomie et d'intoxication aiguë du foie. On a même pu mettre en évidence la synthèse du fibrinogène par des coupes de tissu hépatique in vitro /STRAUB (1963)/.

TAVER et REINHART indiquent, en 1947, que le foie est la seule source de fibrinogène, après des expériences réalisées sur des chiens normaux hépatectomisés, traités par de la méthionine marquée au soufre 35, mais RABY avance l'hypothèse que le tissu réticulo-endothélial participe, dans son ensemble, à cette synthèse.

Il a été noté, dans les expériences de BARNHART, une légère fluorescence sur les leucocytes polynucléaires, que l'on peut interpréter comme témoignant de la phagocytose de produits de dégradation du fibrinogène.

Le fibrinogène est essentiellement une protéine du plasma où il se trouve à une concentration de 3 à 4 g/l (62). Il existe aussi dans le hyalomère des plaquettes à raison de 150 $\mu g/10^9$ plaquettes (32). Il est, en outre, présent dans la lymphe, dans le liquide pleural et le liquide d'ascite.

La demi-vie du fibrinogène a été étudiée par divers auteurs au moyen d'éléments marqués :

- technique à l'Iode 131 = 2,4 jours,
- technique à la méthionine marquée au Soufre 35 = 3,6 jours,
- technique au sulfate marqué = 2,9 jours.

L'emploi d'isotopes radioactifs a permis de déterminer le temps de régénération du fibrinogène qui varie suivant l'élément utilisé :

5,1 jours, 4 jours, avec $^{131}I$ ;
5,6 jours avec la méthionine-$^{35}S$,

mais aussi avec l'âge et l'état de santé des sujets : PILGERAM (119), par marquage au $^{14}C$, observe un temps de renouvellement :

- de 6,30 jours chez des sujets jeunes et normaux,
- de 6,01 jours chez des sujets âgés et normaux,
- de 5,49 jours chez des sujets atteints de thrombose coronaire.

Cette diminution est confirmée par HART et MEUWISSEN (1968) dans diverses formes d'athérosclérose, mais ces auteurs signalent, en outre, que les chiffres observés dans les cas d'hypercholestérolémie sont semblables aux chiffres normaux.

## PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les techniques physiques par étude de la viscosité, de la diffusion de la lumière et par ultra-centrifugation s'accordent pour attribuer aux fibrinogènes humain et bovin un poids moléculaire de 330 000 à 340 000 (62) et une constante de sédimentation $S°_{20,w}$ de 7,8 unités Svedberg. Mais des déterminations plus récentes de JOHNSON et MIHALYI (1965) indiquent, pour le fibrinogène bovin, un poids moléculaire de 400 000 et une constante de sédimentation de $S°_{20,w}$ de 8,14 svedbergs.

A l'électrophorèse, le fibrinogène migre entre les $\beta_2$-et les $\gamma$-globulines ; sa mobilité électrophorétique est de 2,1 x $10^{-5}$ $cm^2/V.s$ et son point isoélectrique est de pH 5,5 (138).

Caractères de solubilité et préparation

Le fibrinogène est l'une des molécules les plus instables du système protéique plasmatique ; ses caractères de solubilité ont permis d'élaborer diverses méthodes de préparation. Il précipite à froid, il flocule quand on chauffe le plasma à 47° et peut ainsi en être séparé. Soluble dans les solutions salines diluées, il précipite aux plus fortes concentrations, en présence de chlorure de sodium à demi-saturation, de sulfate d'ammonium à 25 % de saturation, de tampon phosphate ou de mercurithiocyanate de potassium. La précipitation peut être réalisée avec des composés organiques, tels le chloroforme, l'éthanol ou l'éther. Le fibrinogène constitue 50 % de la fraction I de COHN obtenue par addition au plasma de 8 % d'alcool éthylique à pH 7,2 et représente l'élément essentiel de la fraction F de KEKWICK résultant de l'addition de 11 volumes d'éther à pH 7,7.

Le fibrinogène obtenu suivant ces divers procédés est néanmoins impur, car certaines protéines s'y adsorbent facilement, comme le plasminogène, le facteur anti-hémophilique A et le FSF. Plusieurs procédés de purification ont été décrits : précipitation alcoolique fractionnée en présence de glycine (BLOMBACK), adsorption différentielle par le kaolin (LOEB) ou la bentonite (SOULIER), chromatographie sur DEAE cellulose d'après FINLAYSON et MOSESSON.

Structure de la molécule de fibrinogène

Les mesures de viscosité indiquent que la molécule de fibrinogène a une forme très allongée et que l'on peut la représenter grossièrement comme un ellipsoïde très aplati, de rapport axial de l'ordre de 5. Sa longueur est de 500 à 700 Å, mais elle est réduite à 230 Å au point isoélectrique d'après HALL.

La microscopie électronique (HALL et SLAYTER, 1959) précise l'architecture de la molécule, qui est composée de six demi-sphères, formant trois globules réunis par des filaments protéiques d'une largeur de 15 Å ; l'ensemble mesure 425 ± 25 Å, les globules externes ont un diamètre de 65 Å et le globule central, plus petit, de 50 Å. Il a été calculé, d'après le pouvoir rotatoire, que le tiers de la molécule est enroulé en hélice. L'hypothèse de COHEN (1961), selon laquelle la partie hélicoïdale serait constituée par les filaments protéiques, permet d'expliquer la variation de taille de la molécule en fonction du pH par un déroulement de cette partie hélicoïdale. La microscopie électronique indique, en outre, que le fibrinogène plasmatique et le fibrinogène plaquettaire ont la même structure (37).

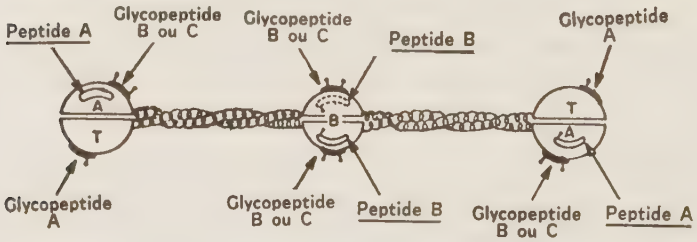



Figure 3

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MOLECULE DE FIBRINOGENE

## CONSTITUTION

L'étude chimique de la molécule de fibrinogène montre qu'elle est constituée de six chaînes peptidiques symétriques deux à deux en ce qui concerne leur extrémité N-terminale : BLOMBACK et YAMASHINA ont déterminé les acides aminés en position N-terminale par la méthode à la phénylthiocarbamide d'EDMAN, qui

donne une analyse quantitative meilleure que la méthode au dinitrophényle de SANGER, employée par les auteurs qui les avaient précédés. Ils ont précisé la nature des acides aminés N-terminaux pour les fibrinogènes de différentes espèces, et trouvé, pour le fibrinogène humain, de l'alanine, de la tyrosine et un troisième acide aminé masqué dans la constitution d'un noyau pyrrolidone.

Le contenu en acides aminés du fibrinogène humain a été déterminé par TRISTRAM (1953) et est caractérisé par la richesse en acide glutamique, acide aspartique, lysine, arginine, leucine et sérine (tableau I).

Tableau I

Composition en acides aminés du fibrinogène d'après TRISTRAM

(en grammes pour 100 g de poids sec)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Glycine | 5,6 | Cystéine | 0,4 | Proline | 5,7 |
| Alanine | 3,7 | Cystine | 2,3 | Acide aspartique | 13,1 |
| Valine | 4,1 | Méthionine | 2,6 | Acide glutamique | 14,5 |
| Leucine | 7,1 | Phényl-Alanine | 4,6 | Lysine | 9,2 |
| Isoleucine | 4,8 | Tyrosine | 5,5 | Arginine | 7,8 |
| Sérine | 7 | Tryptophane | 3,3 | Histidine | 2,6 |
| Thréonine | 6,1 | | | | |

Le fibrinogène contient une faible partie glucidique composée de D-galactose, D-mannose, N-acétyl-glucosamine et de l'acide sialique. MESZAROS (100), ainsi que MESTER et ses collaborateurs (97-98), se sont penchés sur la détermination de ces fractions glucidiques. MESTER met en évidence, par action d'une enzyme protéolytique, la pronase, l'existence de trois glycopeptides

A, B, C et précise que la partie glucidique de A est attachée en position 52 (sur l'asparagine) à la chaîne terminée par la tyrosine ; la connaissance du poids moléculaire des polypeptides (3 400) et de la composition en glucides du fibrinogène et des glycopeptides amène à penser que les glycopeptides A, B, C existent en double sur la molécule de fibrinogène.

Les fibrinoglycopeptides A, B, C sont identiques à ceux obtenus à partir de la fibrine et sont caractérisés par la séquence suivante :

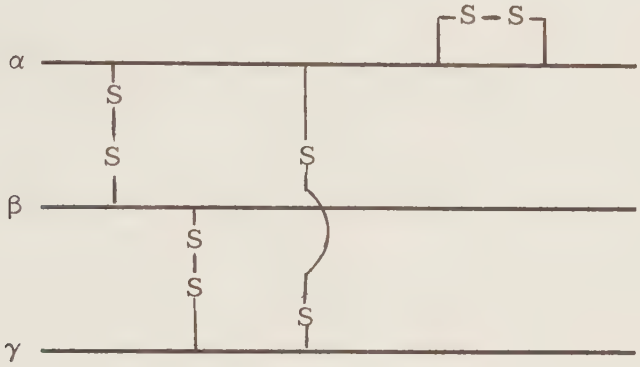
A : (Glucides)-Asp-Lys-Thr-Ser (C-terminal)
B, C : (N-terminal)-Val-Gly-Asp-Arg (C-terminal)
(Glucides)

Les chaînes glucidiques contiennent quatre molécules de D-glucosamine, quatre molécules de D-mannose, trois molécules de galactose et de l'acide sialique : deux molécules dans le cas des glycopeptides B et C mais une seule pour le glycopeptide A.

Le fibrinogène humain ne comporte que des traces de groupements SH libres : on peut donc s'attendre à ce que les chaînes peptidiques soient reliées par des ponts disulfures. La sulfitolyse du fibrinogène (93) permet d'isoler trois chaînes que l'on note $\alpha$, $\beta$ et $\gamma$, nomenclature recommandée par le "Committee on Haemostasis and Thrombosis" (Washington, 1967) et dont les poids moléculaires, respectivement de 47 000, 56 000 et 63 500 permettent d'affirmer que la molécule est un dimère. HENSCHEN (1962) avait étudié la réactivité des ponts disulfure envers les sulfites dans différents solvants et en avait déduit que les 28 ou 29 ponts disulfure du fibrinogène ne pouvaient exister qu'à l'intérieur des chaînes.

BLOMBACK et ses collaborateurs (24-26) indiquent, au contraire, qu'après rupture des liaisons méthionyl par le bromure de cyanogène (BrCN), on obtient une fraction qui contient les extrémités N-terminales destrois chaînes $\alpha$, $\beta$ et $\gamma$. Les fragments correspondants de ces trois chaînes peuvent être libérés par réduction et alcoylation.

Comme ils contiennent des résidus demi-cystine, ceci suggère qu'à l'extrémité N-terminale de la molécule de fibrinogène, les trois chaînes sont reliées par un "noeud disulfure" composé de cinq ponts disulfure et BLOMBACK (24) retient la configuration suivante :




Il interprète la structure triglobulaire du fibrinogène comme celle d'un dimère symétrique, où les nodules extrêmes contiendraient les deux noeuds disulfure N-terminaux et dont le nodule central représenterait la jonction des extrémités carboxy-terminales des deux monomères de fibrinogène (figure 4).

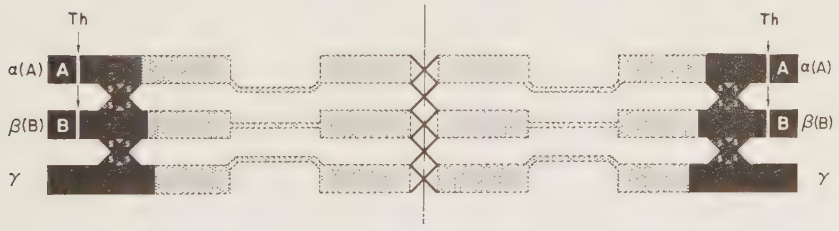



Figure 4

STRUCTURE DU FIBRINOGENE /Selon BLOMBACK (24)/

# TRANSFORMATION DU FIBRINOGENE EN FIBRINE

La conversion du fibrinogène en fibrine se fait physiologiquement sous l'action de la thrombine dérivant de la prothrombine synthétisée au niveau du foie.

La fibrinoformation se déroule en trois étapes (figure 5) :

- une protéolyse partielle du fibrinogène par la thrombine aboutit au monomère de fibrine ;
- l'agrégation de ces monomères provoque la formation d'un polymère intermédiaire et instable ;
- un facteur plasmatique, facteur XIII ou FSF, stabilise la fibrine soluble sous forme de fibrine insoluble.

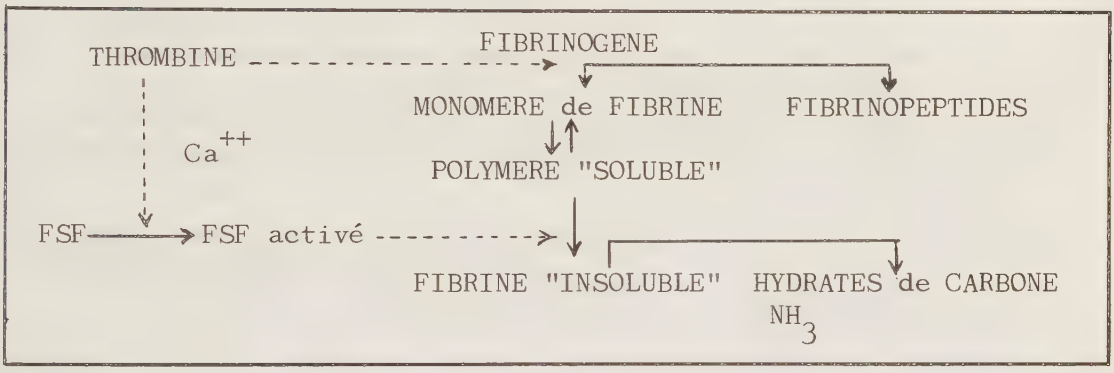



Figure 5

SCHEMA DE LA FIBRINOFORMATION (69)

THROMBINE

La thrombine a été découverte par SCHMIDT en 1872. Cette enzyme, comme le pensait SCHMIDT, ne préexiste pas dans le plasma : elle se forme à partir de la prothrombine, qui est son précurseur plasmatique, sous l'effet de systèmes activateurs extrinsèque et intrinsèque.

Les déterminations récentes du poids moléculaire de la thrombine humaine donnent des valeurs qui dépendent de la technique utilisée. Par chromatographie, LANCHANTIN et ses collaborateurs (1965) obtiennent le chiffre de 35 000 alors que l'analyse de la cinétique d'action de la thrombine, effectuée par KEZDY (1965), aboutit à une valeur maximale de 32 600. Par l'étude de l'extrémité N-terminale, MAGNUSSON (1965) suggère que le poids moléculaire de la thrombine est compris entre 26 000 et 32 000 et détermine en outre la séquence des acides aminés N-terminaux : Ileu-Val-Glu-Gly ... Par ailleurs, SEEGERS indique que la thrombine bovine est composée de deux chaînes terminées par l'isoleucine et la thréonine.

L'obtention de la thrombine pure est particulièrement difficile. Elle suppose la purification de la prothrombine extraite de la fraction III de COHN, puis son activation par des facteurs suffisamment purifiés (facteur X activé, venin de vipère Russel en présence de facteur V ou trypsine). En fait, les préparations de thrombine sont fréquemment contaminées par des traces de facteurs VII, X, XI ou de plasmine (143). Ceci explique les difficultés rencontrées pour déterminer le poids moléculaire et étudier les propriétés physico-chimiques.

Les propriétés enzymatiques de la thrombine sont beaucoup mieux connues : c'est une hydrolase qui présente une activité protéasique et une activité estérasique.

Son activité protéolytique se manifeste sur le fibrinogène, la caséine, l'albumine, la gélatine ainsi que sur d'autres protéines (lacto-globulines, insuline, sécrétine) et même sur la fibrine.

L'activité estérasique est semblable à celle de la trypsine qui a la même activité protéolytique sur le fibrinogène que la thrombine. Cette activité s'exerce sur les esters de la L-lysine, sur les esters de l'arginine à liaison amide, ainsi que sur divers substrats synthétiques utilisés pour la mesure des activités estérasiques (TAMe, BAMe, BAEe, TLMe...).

De plus, la thrombine aurait la propriété d'activer certains zymogènes, tels le trypsinogène, le plasminogène et le chymotrypsinogène A /ENGEL, ALEXANDER et PECHET (50)/.

Il est à noter que les activités estérasiques et protéolytiques de la thrombine sont inhibées par le DFP /BAILEY et BETTELHEIM (1955), GLADNER et LAKI (1956)/, ce qui laisse supposer que le centre actif de la thrombine est un résidu sérine au sein d'une séquence Gly-Asp-Ser-Gly-Glu-Ala, sur lequel se fixerait le DFP.

## ACTION PROTEOLYTIQUE DE LA THROMBINE SUR LE FIBRINOGENE

### Mise en évidence

HAMMARSTEN avait remarqué, dès 1876, qu'après la formation du caillot de fibrine, le surnageant contenait des substances protéiques en très faible quantité. Par analogie avec le mécanisme de coagulation de la caséine, il avait suggéré que le fibrinogène subissait une hydrolyse au cours de la coagulation. NOLF a été le premier à proposer, en 1908, une action protéolytique de la thrombine mais il a fallu attendre 1951 pour mettre en évidence cette protéolyse limitée du fibrinogène sous l'action de la thrombine, par l'analyse des acides aminés N-terminaux du fibrinogène et de la fibrine /BAILEY et BETTELHEIM (1951)/.

Cette analyse, effectuée d'abord sur le fibrinogène bovin, donne des résultats analogues pour le fibrinogène humain /LORAND et MIDDLEBROOK (1953)/ qui présente deux chaînes $\alpha$ terminées par l'alanine, deux chaînes $\beta$ terminées par un noyau pyrrolidone et deux chaînes $\gamma$ terminées par la tyrosine. Pour la fibrine humaine, on met en évidence 4 chaînes terminées par de la glycine et les deux chaînes $\gamma$ terminées par de la tyrosine, ce qui évoque une rupture de quatre chaînes du fibrinogène provoquant l'apparition de glycine N-terminale dans la fibrine.

La preuve définitive de l'action protéolytique de la thrombine a été fournie par la mise en évidence, dans le surnageant de caillots, de peptides acides possédant les acides aminés N-terminaux perdus par le fibrinogène au cours de la coagulation /LORAND, BETTELHEIM, BAILEY (1952)/.

Les fibrinopeptides

On distingue essentiellement deux espèces de peptides : les fibrinopeptides A, libérés à partir des chaînes $\alpha$ et les fibrinopeptides B, libérés à partir des chaînes $\beta$ ; leurs poids moléculaires respectifs sont de 2 000 et 2 400. On désigne par AY un fibrinopeptide A privé de l'alanine N-terminale (150). L'existence de ce peptide rend compte de la présence d'acide aspartique sur le fibrinogène, d'abord considérée comme peu significative par BLOMBACK et YAMASHINA (1958), puis vérifiée par Von KORFF (1963). Un quatrième fibrinopeptide, noté AP, a été isolé à partir du fibrinogène humain et correspond à un peptide A dont la sérine a été phosphorylée. En présence de sérum, le fibrinopeptide A peut perdre l'alanine N-terminale. On ne sait pas si l'hétérogénéité des fibrinopeptides A est due à la dégradation du fibrinogène in vitro ou si elle existe in vivo. L'existence des divers peptides A peut signifier que l'on trouve, suivant les individus, différents types moléculaires de fibrinogène mais il a été montré, dans une étude portant sur une centaine de personnes, que les fibrinopeptides A, AP, AY et B étaient présents dans tous les cas /BLOMBACK et GRONDAHL (1966)/.

Il est à noter, sur la séquence des acides aminés des fibrinopeptides (figure 6), que la structure Asp-Ser-Gly est la même qu'autour du site actif de diverses enzymes, en particulier de la thrombine, mais la signification de cette similitude n'a pas encore été élucidée.

A : H-Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-OH

AP : H-Ala-Asp-Ser-P-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-OH

AY : H-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-OH

B : Pyr-Gly-Val-Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg-OH

Figure 6

SEQUENCE D'ACIDES AMINES DES FIBRINOPEPTIDES HUMAINS (25)

## Libération des fibrinopeptides

Il a été noté, par BETTELHEIM (1956), que la libération du fibrinopeptide B est plus lente que celle du peptide A. BLOMBACK et VESTERMARK (1958) indiquent que la formation des peptides A (AP+AY+A) est parallèle à la formation de fibrine, alors que la libération du peptide B est maximale au moment où cesse la formation de fibrine. Lorsque 40 % des peptides A ont été libérés, on n'observe que 8 % de peptides B dans le cas de fibrinogène bovin. Des résultats semblables ont été obtenus sur le fibrinogène humain par ABILDGAARD (1), avec apparition de la coagulation dès la libération de 40 % de fibrinopeptides A dans un système contenant du fibrinogène purifié et de la thrombine, ou de 6 % seulement en présence de plasma ; cette accélération de la coagulation étant alors attribuée aux protéines plasmatiques, agissant par leurs propriétés physiques de colloïdes non spécifiques.

BLOMBACK et ses collaborateurs (26) signalent en outre l'apparition, après un délai important, d'un tripeptide Gly-Pro-Arg qui traduit une protéolyse plus avancée du fibrinogène par la thrombine.

Mécanisme de la libération des fibrinopeptides

La protéolyse du fibrinogène, sous l'action catalytique de la thrombine, est un phénomène réversible /LASKOWSKI, RAKOWITZ et SHERAGA (1952)/ dont le mécanisme a été suggéré par LORAND (1965). Par analogie avec le mode d'action d'autres enzymes protéolytiques possédant un résidu sérine actif, il y aurait formation d'un complexe fibrinogène-thrombine. Ce complexe se dissocierait dans une réaction d'acylation en libérant le monomère de fibrine. Ensuite, une hydrolyse régénérerait la thrombine par désacylation, en faisant apparaître les fibrinopeptides (figure 7). La réaction d'acylation se produirait par l'intermédiaire de l'arginine carboxy-terminale des fibrinopeptides.

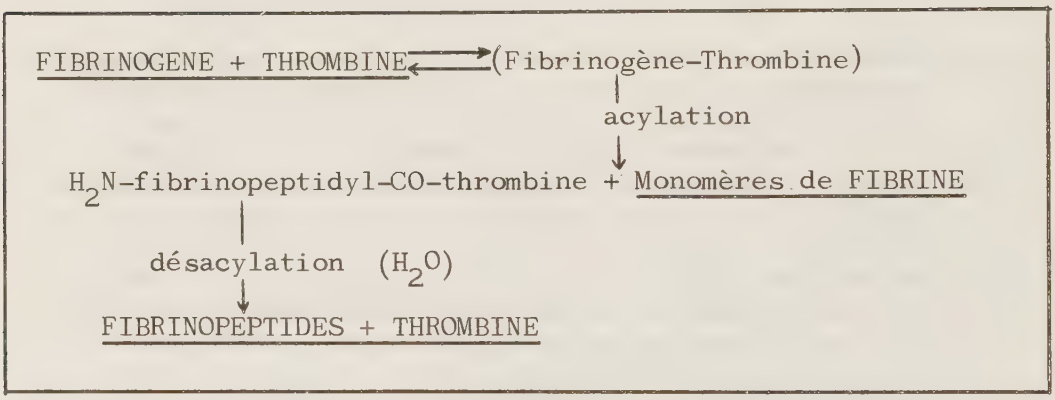



Figure 7

MODE D'ACTION DE LA THROMBINE /D'après LORAND (1965)/

Dans cette protéolyse, une particularité remarquable réside dans la spécificité d'action de la thrombine qui, sur une molécule de fibrinogène, provoque la rupture de quatre liaisons arginine-glycine qui permettent la libération des fibrinopeptides A et B. Toutefois, une action prolongée de la thrombine ferait appa-

raître le tripeptide Gly-Pro-Arg (24-26). Cette spécificité étroite serait liée, non pas à la molécule de fibrinogène dans son ensemble, mais à la structure des chaînes α et β, puisque, d'après HENSCHEN (1962), la rupture des mêmes liaisons se produit sur les chaînes séparées par sulfitolyse. Ceci laisse supposer une certaine complémentarité de structure entre la thrombine et les chaînes peptidiques d'autant que le fibrinogène coagule mieux en présence d'une thrombine homologue /MENACHE (95)/.

Le problème de la spécificité d'espèce dans l'action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène a été étudié par de nombreux auteurs /SEEGERS et SMITH (1942), FANTL et EBBELS (1953), BURSTEIN et GUINAND (1954), STORMORKEN (1957), DOOLITTLE, ONCLEY et SURGENOR (1962)/ qui ont mis en évidence, par étude des temps de coagulation, une spécificité de fibrinogène parmi les diverses espèces. STORMORKEN était le seul à signaler, en outre, une spécificité de thrombine, notable dans le cas d'espèces animales éloignées. Dans le mécanisme de la protéolyse, DOOLITTLE (1965) a pu néanmoins observer des différences significatives : si l'on fait agir une thrombine homologue sur du fibrinogène de lamproie, les fibrinopeptides A et B sont libérés et leurs vitesses d'apparition sont semblables ; avec de la thrombine bovine, seul le fibrinopeptide B apparaît, mais la coagulation a tout de même lieu. Ceci laisse supposer que la libération du peptide B met en jeu une action moins sélective de la thrombine que la libération du peptide A.

Plus récemment, en 1965, BLOMBACK et TEGGER-NILSSON ont étudié la cinétique de l'interaction fibrinogène-thrombine chez différents mammifères. Les cinétiques sont variables pour différents fibrinogènes avec une même thrombine, mais semblables pour un même fibrinogène avec diverses thrombines. Les variations observées pour les différents fibrinogènes sont liées à des modifications de structure dans la partie de la molécule correspondant aux fibrinopeptides. Pour BLOMBACK (24), le "noeud disulfure" du fibrinogène donnerait à la molécule une configuration permettant l'action de la thrombine.

La structure précise responsable de l'action de la thrombine sur les quatre liaisons arginine-glycine déterminant la libération des fibrinopeptides A et B a fait l'objet de nombreuses hypothèses. Pour LORAND (1961) c'est la séquence d'acides aminés au voisinage de la liaison arginine-glycine qui est significative, en particulier par la présence d'acides aminés dicarboxyliques. Il envisage, en outre, (1965) un effet stérique clé-serrure, complété par des phénomènes électrostatiques dus à la présence, sur les fibrinopeptides, de sites cationiques complémentaires de sites anioniques de la thrombine, comme l'indique la figure 8.

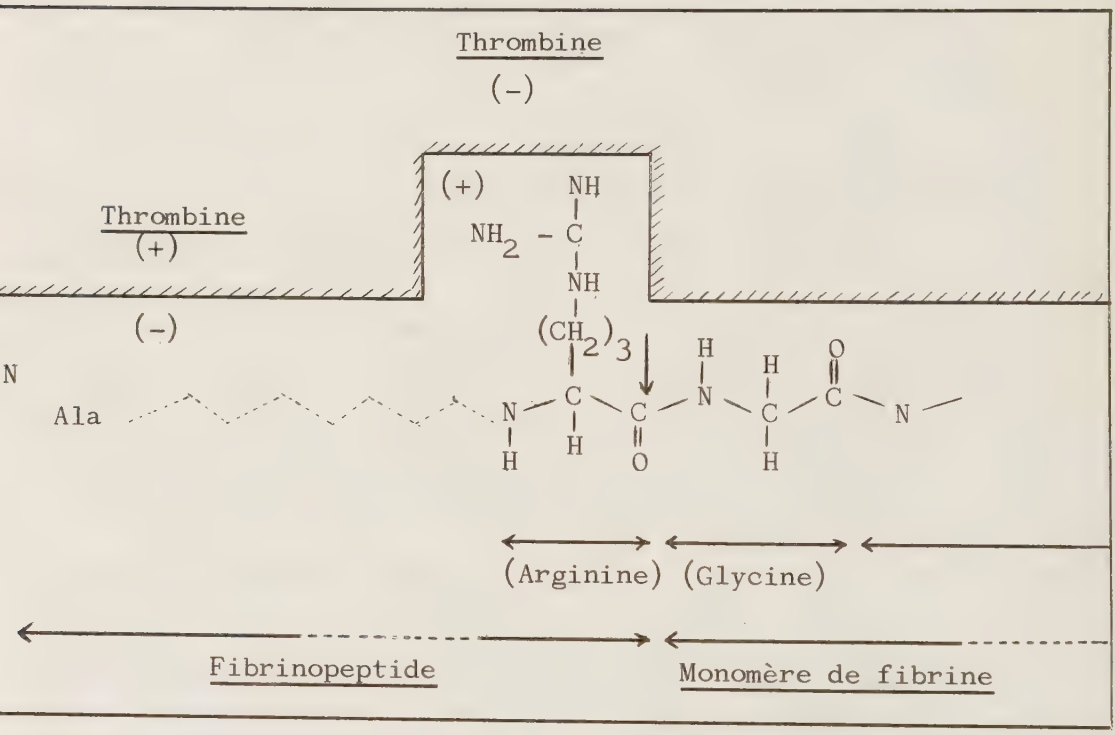



Figure 8

ANCRAGE DE LA THROMBINE SUR LE FIBRINOGENE HUMAIN
/D'après LORAND (1965)/

Un certain nombre d'auteurs signalent l'importance des parties glucidiques du fibrinogène. CHANDRASEKHAR (34) note la libération de 18 % d'acide sialique au cours de la coagulation ; il indique que l'élimination d'acide sialique (par la neuramidase) provoque l'augmentation de la coagulabilité du fibrinogène. Néanmoins, dans ces conditions, MESTER (97) montre que le caillot formé est de mauvaise qualité et, de plus, qu'un excès d'acide sialique provoque une dysfibrinogénémie responsable d'une coagulation retardée (99). Il a donc été considéré que la présence de sucres favoriserait l'ancrage de la thrombine au niveau du site sur lequel elle agit /LAKI (1964)/, et, dans ce cas, les parties glucidiques constitueraient les repères permettant d'obtenir la précision nécessaire à l'ancrage de la thrombine sur le fibrinogène.

L'étude des fibrinopeptides de différentes espèces animales est une source importante d'enseignements /BLOMBACK (1966)/. Comme le peptide A est libéré le premier par la thrombine, on peut s'attendre à ce qu'il renferme des caractéristiques structurales nécessaires à l'action de la thrombine. En effet, il est observé que les acides aminés du peptide A, en trois endroits déterminés de la molécule, sont les mêmes pour toutes les espèces étudiées. Si l'on prend comme point de repère la liaison arginine-glycine, on trouve l'arginine en position 1, la glycine en position 5 et la phényl-alanine en position 9. En outre, la thrombine agit sur la sécrétine par rupture d'une liaison arginine-glycine et il est à remarquer que, pour ce substrat, en position 9 à partir de cette liaison, on retrouve la phényl-alanine comme acide aminé. Ceci suggère que la distance entre l'arginine 1 et la phényl-alanine 9 est principalement responsable de la spécificité d'action de la thrombine. Pour le peptide B des espèces animales envisagées, le seul point commun est l'arginine en position 1, ce qui indique que la libération du peptide B est le fait d'une spécificité plus large de la thrombine, en accord avec les résultats de DOOLITTLE (1965).

La comparaison des fibrinopeptides de diverses espèces a permis à BLOMBACK (1966) de retrouver la classification morphologique usuelle mais à quelques exceptions près : d'après la structure de leurs fibrinopeptides, la chèvre et le mouton sont plus voisins du renne que du boeuf auquel ils sont reliés dans les systèmes classiques. BLOMBACK détermine ainsi des relations phylogénétiques entre les espèces animales qui placent donc, en particulier, la chèvre et le mouton sur la lignée des cervidés et non des bovidés. Il est d'ailleurs à remarquer que les fibrinopeptides A de mulet sont constitués, à parts égales, de fibrinopeptides A de cheval et d'âne, ce qui met en évidence l'hybridation au niveau cellulaire même.

## POLYMERISATION DES MONOMERES DE FIBRINE

La polymérisation des monomères de fibrine engendrés après élimination des fibrinopeptides par la thrombine est le stade ultime de la fibrinoformation. Les monomères de fibrine constituent un réseau organisé par agrégation de polymères intermédiaires suivant le schéma d'ABILDGAARD (7) :

m monomères de fibrine $\rightleftharpoons$ polymère de fibrine

n polymères de fibrine $\rightleftharpoons$ gel de fibrine.

La polymérisation et la structure du polymère obtenu dépendent d'un certain nombre de variables (pH, force ionique, température) ainsi que de diverses substances ajoutées au milieu (activateurs, inhibiteurs). L'association des monomères peut se faire "bout à bout" ou "côte à côte". A pH bas et à force ionique faible, c'est l'agrégation latérale qui est prédominante et qui donne naissance à un caillot opaque formé de fibres grossières [FERRY et MORISSON (1947)]. C'est dans ces conditions, à pH 6,2, selon LATALLO et coll. (80), que la coagulation par la thrombine est la plus rapide. Si l'on augmente le pH et la force ionique, on voit apparaître un caillot plus translucide, formé de fibres fines, montrant la prédominance de l'agrégation "bout à bout".

L'étude de la diffraction des rayons X par la fibrine /STRYER, COHEN, LANGRIDGE (1963)/ tout comme la microscopie électronique /HAWN et PORTER (1947), HALL (1963)/mettent en évidence une longueur élémentaire de 230 Å environ, sans indiquer de différence structurale entre la fibrine et le fibrinogène. Cette valeur, qui correspond à la longueur de la molécule de fibrinogène au point isoélectrique, est à l'origine d'une hypothèse suivant laquelle le fibrinogène serait ramené à sa taille minimale au cours de la coagulation /HALL et SLAYTER (1959)/. BANG (1964) explique la polymérisation de la fibrine par un arrangement des monomères de fibrine avec un recouvrement partiel, ce qui confirme la théorie de FERRY (1954), élaborée au travers de l'étude des polymères intermédiaires. Si, au cours de la fibrinoformation, la gélification est inhibée par l'hexa-méthylène-glycol /SCHULMAN et FERRY (1951)/, on peut mettre en évidence un polymère intermédiaire de fibrine, dont la longueur est de l'ordre de 3 000-4 000 Å et le poids moléculaire d'environ 5 000 000. Ceci correspond à l'agrégation, en moyenne, de 15 monomères de fibrine. La largeur du polymère est double de celle du fibrinogène et sa longueur d'environ 7 fois celle de la molécule de fibrinogène, ce qui permet d'établir un modèle de polymérisation de la fibrine (figure 9), suivant lequel le phénomène élémentaire serait une dimérisation latérale, avec un décalage responsable d'un recouvrement partiel des monomères.

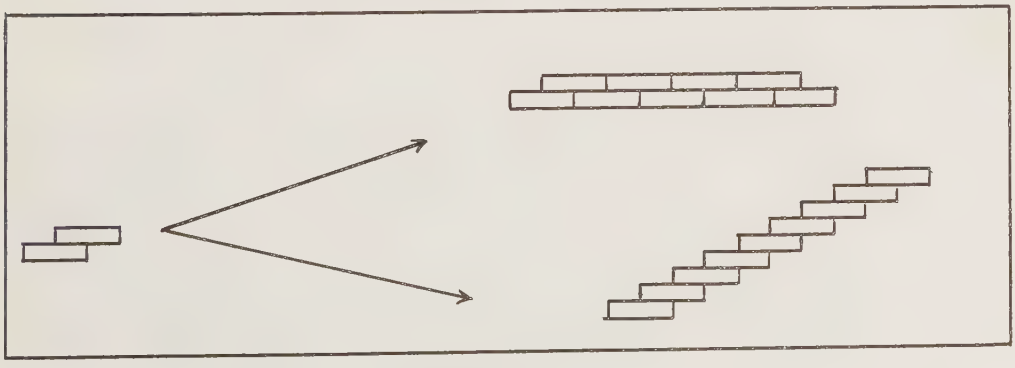


Figure 9

MODELE DE FORMATION DES POLYMERES INTERMEDIAIRES DE FIBRINE /D'après FERRY ET COLL. (1954)/

Les travaux de BANG en microscopie électronique (14) permettent d'admettre le modèle de polymérisation en espaliers de FERRY en mettant en évidence la structure des fibres de fibrine, qui correspond à l'agrégation latérale des polymères intermédiaires, et en justifiant la forme des stries observées sur les fibres de fibrine à leurs points de branchement (figure 10).

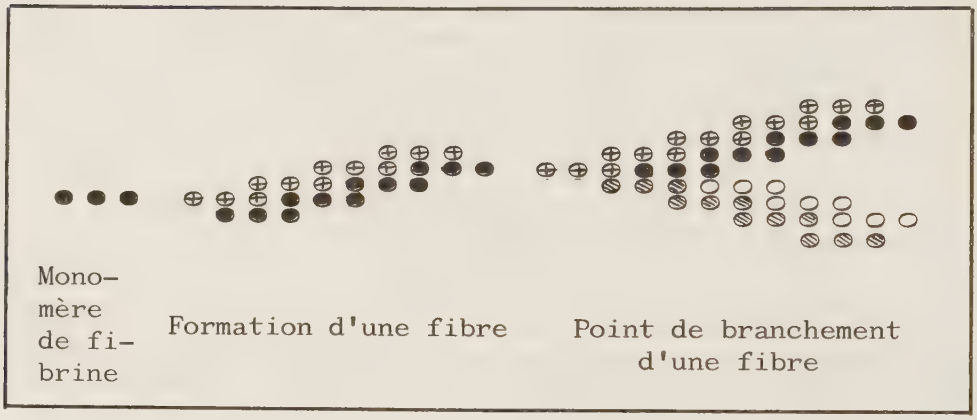



Figure 10

FORMATION DES FIBRES DE FIBRINE PAR POLYMERISATION EN ESPALIERS /D'après BANG (14)/

Il est connu, depuis les travaux de ROBBINS (1944), que les propriétés du polymère de fibrine dépendent des conditions de sa formation : la fibrine obtenue à partir d'un fibrinogène pur soumis à l'action de la thrombine est soluble dans l'urée 5M, mais le caillot est complètement insoluble dans ce milieu s'il est formé en présence d'un facteur sérique et de calcium. LOEWY et EDSALL (1954) ont montré que l'adjonction de sérum et de calcium à la fibrine soluble dans l'urée (fibrine S)

permet d'obtenir un caillot insoluble (fibrine I). L'élément responsable de cette stabilisation a été purifié par divers auteurs dont LORAND (88) et LOEWY (1961) et est appelé FSF (facteur stabilisant de la fibrine), facteur XIII ou fibrinase.

La molécule de FSF a la forme d'un ellipsoïde de révolution allongé, de 36 Å de petit axe et de 61 Å de grand axe, et de poids moléculaire 350 000. Dans certaines conditions, le FSF se dissocie en éléments de poids moléculaire 110 000, ce qui permet de supposer que le FSF, tout comme le fibrinogène, est formé de trois subunités /LOEWY (1961)/, mais cette dissociation est inhibée par la cystéine. De même, si le FSF a tendance à former des dimères ou des tétramères, avec perte de son activité biologique, ces phénomènes sont réversibles en présence de cystéine. Ces remarques permettent d'expliquer les observations suivant lesquelles des composés à groupements SH libres pourraient remplacer le facteur XIII. Néanmoins, ALLINGTON (10), après avoir préparé des monomères de fibrine dépourvus de FSF, montre que la cystéine est sans effet sur la solubilité du caillot. L'action des composés à groupements SH libres pourrait être interprétée comme une réactivation de traces de FSF contaminant les fibrinogènes étudiés par divers auteurs. Ces phénomènes étaient à l'origine de la théorie décrivant la polymérisation de la fibrine comme le résultat d'échanges de groupements disulfures entre monomères de fibrine. On considère maintenant que le FSF, activé en présence de $Ca^{++}$ sous l'action de la thrombine, peut-être par rupture d'une liaison arginine-glycine (74), se comporte comme une transamidase. En effet, au cours de la polymérisation de la fibrine, de l'ammoniac est libéré à raison d'une à deux molécules par monomère /LOEWY (1963)/, et l'on voit disparaître les groupements N-terminaux du fibrinogène.

D'après LORAND et JACOBSEN (89), la transpeptidation met en jeu un radical donneur (une glycine N-terminale d'un premier monomère de fibrine) et un groupement accepteur (le groupement β carboxylique de l'asparagine d'un second monomère). L'existence d'un

tel mécanisme est confirmée par les travaux de ces auteurs qui, après avoir envisagé deux types théoriques d'inhibiteurs compétitifs de la transamidation, les mettent en évidence :

- Composés donneurs (à groupement amine)

$H_2N-CH_2-COO-CH_2$

$H_2N-CH_2-COO-CH_2-CH_3$

$H_2N-CH_2-CO-NH_2$

$H_2N-CO-NH-CH_2-COONa$

$H_2N-OH$

Histamine

- Composés accepteurs (à groupement amide)

L-carbobenzoxy-NH-CH-$(CO-NH_2)$-$CH_2CONH_2$

$(L\text{-carbobenzoxy-NH-CH-COO})^-CH_2\ CONH_2Na^+$

Carbobenzoxy-NH-$CH_2$-$CH_2$-$CO-NH_2$

Ce mécanisme explique la perte d'hydrates de carbone et d'acide sialique subie par la fibrine au cours de la polymérisation (34-97-98) puisque de tels éléments sont reliés à l'asparagine. De plus, une anomalie de la polymérisation observée dans une dysfibrinogénémie par excès d'acide sialique (99) serait alors la conséquence d'une configuration défectueuse du fibrinogène au voisinage du site actif et non l'indice d'un rôle particulier des fractions glucidiques dans la polymérisation de la fibrine. Des travaux plus récents /CHEN et DOOLITTLE (35)/ décrivent la transpeptidation entre la lysine (donneur) d'une chaîne $\alpha$ ou $\gamma$ et la glutamine (accepteur) d'une chaîne $\gamma$ et indiquent que toutes les chaînes $\gamma$ participent à des liaisons covalentes dans le polymère de fibrine, qui sont des liaisons $\gamma$-$\alpha$ (dans un tiers des cas) ou des liaisons $\gamma$-$\gamma$. Depuis, LORAND (87), qui avait décrit le mécanisme de transpeptidation entre glycine et asparagine, s'est rangé à l'avis de CHEN et DOOLITTLE mais, dans cette hypothèse,

la libération des hydrates de carbone ne serait due ni à l'action du FSF ni à celle de la thrombine /SEEGERS (136)/.

## ACTIVATEURS ET INHIBITEURS

Les réactions qui permettent de passer du fibrinogène au caillot de fibrine sont sujettes à des modifications de cinétique quand le système fibrinogène-thrombine renferme certaines substances, qui seront dénommées activatrices si elles sont responsables d'un accroissement de la vitesse de réaction et inhibitrices dans le cas contraire.

### Activateurs

Le plasma renferme de nombreuses substances activatrices de la coagulation, mais dont l'action se manifeste au niveau de la thrombinoformation et non de l'évolution du système fibrinogène + thrombine (fibrinoformation). Il est à signaler que la thrombine est, elle-même, catalyseur de sa formation, en ce sens que la thrombine résultant de l'activation du système extrinsèque est activatrice du système intrinsèque qui, sauf dans certains cas pathologiques (hémophilies...), est la source principale de la thrombine.

Au cours de la fibrinoformation, l'activateur majeur est l'ion $Ca^{++}$, qui se manifeste aussi au niveau de la thrombinoformation. En fait, l'ion $Ca^{++}$ intervient dans la formation du caillot "insoluble" et se trouve considéré soit comme catalyseur de l'action du FSF sur la fibrine soluble (69) soit comme catalyseur de l'activation du FSF par la thrombine (91) ; en outre, LORAND (91) indique que le calcium ionisé permet d'accélérer la phase de polymérisation. L'effet essentiel est malgré tout plus précoce, et l'ion $Ca^{++}$ intervient dans l'activation de la prothrombine par un effet d'origine électrostatique qui rend le calcium activateur aux concentrations comprises entre $10^{-2}$ et $10^{-1}$ M, et inhibiteur hors de cet intervalle (19).

Le temps de thrombine est raccourci par la protamine /FERGUSON (1940)/, l'acacia /SEEGERS et SMITH (1942)/ et le dextran /LAURELL (1951)/. RABY et BERTRAND (127) signalent néanmoins que les caillots obtenus en présence de dextran (avec ou sans calcium) n'ont pas l'architecture périodique ni les propriétés dynamiques des caillots de fibrine normaux ; la trame de fibrine est caractérisée par une perte de la périodicité et par une dilacération des fibres qui indiquent que la polymérisation n'est pas normale : on doit donc considérer que, si le dextran est un activateur de la polymérisation, c'est aussi un inhibiteur de la structuration du caillot de fibrine. BURSTEIN (1952) et GODAL (58) ont montré qu'il y a une relation entre l'effet "fibrinoplastique" de substances telles que le dextran et la protamine et le fait qu'elles rendent le fibrinogène insoluble, cette relation étant aussi observée pour certaines conditions de milieu (pH bas, température peu élevée, force ionique faible). Une telle corrélation fait d'ailleurs supposer que la polymérisation met en jeu des structures communes au fibrinogène et à la fibrine.

Inhibiteurs

Pour porter l'attention sur les divers mécanismes responsables de la neutralisation de la thrombine, SEEGERS avait, en 1954, créé une nomenclature "arbitraire et en partie théorique" des substances inhibitrices, cataloguées en "antithrombines" I, II, III... Ce système a été généralisé, étendu à des substances dont l'effet ne se manifeste qu'aux étapes tardives de la fibrinoformation et que l'on ne devrait pas considérer comme des antithrombines authentiques.

On désigne par activité antithrombine I la propriété que présente la fibrine d'adsorber la thrombine, ce qui est un effet non spécifique et sans rapport avec une destruction de la thrombine ou une inhibition de son action puisqu'elle ne peut se manifester qu'une fois la fibrine formée.

L'antithrombine II désigne le cofacteur de l'héparine /SEEGERS (1954)/, toutefois VERMYLEN et VERSTRAETE (156) proposent d'appliquer ce terme au complexe actif héparine + cofacteur, alors que QUICK (126), dès 1938, avait suggéré l'identité du cofacteur de l'héparine et de l'antithrombine progressive, que la nomenclature usuelle note antithrombine III. L'ambiguïté provient du fait que le cofacteur de l'héparine a été défini d'abord comme inhibiteur de la thrombinoformation (antithrombine II), et l'antithrombine III comme une substance qui dégrade (lentement) la thrombine. Mais la plupart des études de purification n'ont pu séparer le cofacteur de l'antithrombine III /MONKHOUSE, FRANCE et SEEGERS (102), ABILDGAARD (2-3)/ ; de plus, les déficits héréditaires en antithrombine III s'accompagnent d'un déficit en cofacteur /EGEBERG (48)/ et ces faits justifient l'identité des antithrombines II et III, qui est généralement admise (4-31-102). BURSTEIN et LOEB (31) montrent que l'héparine agit en augmentant l'affinité de la thrombine pour l'antithrombine. HENSTELL et KLIGERMAN (66) précisent que le mécanisme d'action met en jeu l'antithrombine III, son inhibiteur et un facteur plaquettaire ; l'héparine dissocie le complexe antithrombine-inhibiteur par action compétitive pour former un complexe héparine-antithrombine qui peut réagir avec la thrombine, suivant le schéma :

(Antithrombine-Inhibiteur) + Héparine $\rightleftharpoons$ (Antithrombine-Héparine) + Inhibiteur

(Antithrombine-Héparine) + Thrombine $\rightleftharpoons$ (Antithrombine-Thrombine) + Héparine

Il est à noter, d'après ce schéma, que l'héparine apparaîtrait en fait comme le cofacteur de l'antithrombine III. Ces auteurs indiquent que, seule, la vitesse d'inactivation de la thrombine est influencée par l'héparine et non la quantité de thrombine neutralisée, et que l'activité de la thrombine ne reparaît pas après neutralisation par la protamine (66), mais ABILDGAARD (4) précise que, si l'inhibition progressive est irréversible, l'adjonction de protamine empêche cette inhibition de se poursuivre, sans que cette observation soit en contradiction avec le schéma proposé par HENSTELL et KLIGERMAN.

ABILDGAARD (6-7) étudie aussi une autre $\alpha_2$-globuline plasmatique, l'$\alpha_2$-macroglobuline, responsable d'une inactivation de la thrombine semblable à celle due à l'antithrombine III, mais dont la cinétique d'action est plus lente, puisque ces deux substances existent à des concentrations molaires semblables dans le plasma et que l'$\alpha_2$-macroglobuline n'intervient que pour 25 % dans l'activité antithrombine progressive.

Si l'inhibition puissante provoquée par l'héparine associée à son cofacteur est connue depuis longtemps /HOWELL et HOLT (1918)/, l'action de l'héparine seule a fait l'objet de conclusions contradictoires : d'après certains auteurs, elle prolonge le temps de thrombine de façon modérée /MELLANBY (1934), LYTTLETON (1954), GODAL (1961)/ alors que d'autres la déclarent sans effet /HOWELL et HOLT (1918), JAQUES et MUSTARD (1940), HJORT et STORMORKEN (1957)/. ABILDGAARD (4) attribue ces divergences à la difficulté d'interprétation des temps de thrombine en présence d'héparine, en raison de l'influence de cette substance sur la phase de polymérisation, déjà observée par GODAL (58). ABILDGAARD étudie donc la libération, par la thrombine, des fibrinopeptides du fibrinogène humain en présence d'héparine - comme l'avait fait BLOMBACK (1958) avec des réactifs bovins - et enregistre, en fonction du temps, l'apparition de glycine N-terminale. Il met ainsi en évidence une inhibition immédiate de l'action de la thrombine, indépendante de la durée de réaction, et réversible par l'adjonction de protamine en quantité adéquate (un excès de protamine serait inhibiteur). ABILDGAARD suggère que l'héparine agit en provoquant la formation d'un complexe /Thrombine-Fibrinogène-Héparine/.

L'antithrombine IV aurait une action semblable à celle de l'antithrombine III, mais neutraliserait la thrombine au cours de sa formation à partir de la prothrombine /SORIA (142)/. Néanmoins, SEEGERS et ses collaborateurs ont été amenés à conclure qu'une substance telle que l'antithrombine IV n'existe pas et, de toute façon, son rôle dans la conversion du fibrinogène en fibrine ne semble pas avoir été démontré.

Un anticoagulant "héparine-like" a été mis en évidence par LOELIGER et HERS (1957) chez un sujet présentant une polyarthrite rhumatoïde, dont la tendance hémorragique a été attribuée à une "antithrombinémie chronique" due à des taux élevés d'une substance nommée "antithrombine V". Cette antithrombine a été aussi mise en évidence dans des cas de myélome multiple /LARRIEU et coll. (1958), VERMYLEN et VERSTRAETE (156)/. Elle est considérée, suivant les auteurs, comme une antithrombine véritable /VERSTRAETE et VERMYLEN (157)/ ou comme une antipolymérase /SORIA (142)/.

Les produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine par la plasmine ont une action inhibitrice sur la fibrinoformation : en leur présence, le temps de thrombine est allongé /NIEWAROWSKI et KOWALSKI (108)/, ce qui leur a valu la désignation d'antithrombine VI. Ils sont responsables d'une inhibition de la protéolyse du fibrinogène /LATALLO et coll. (79)/ ainsi que de la polymérisation de la fibrine /FLETCHER et coll. (1962), GODAL et HELLE (1963)/.

Dans certains cas pathologiques, apparaissent divers inhibiteurs de la fibrinoformation, comme les antithrombines immunes /VERMYLEN et VERSTRAETE (156)/, des inhibiteurs du FSF /LEWIS et coll. (1967), LORAND et coll. (90), GODAL (59)/ ou des fibrinogènes anormaux /IMPERATO et DETTORI (1958), MENACHE (1963), BECK (1965), Von FELTEN (1966), SORIA (142), BLOMBACK (27)/. Ces fibrinogènes anormaux se caractérisent par une anomalie d'une phase, au moins, de la fibrinoformation, c'est-à-dire de la protéolyse du fibrinogène, de l'agrégation en fibrine S ou de la stabilisation en fibrine I. Ce défaut provient d'une mauvaise conformation moléculaire du fibrinogène au niveau d'un site actif de l'une de ces trois phases ; il ne touche qu'une certaine proportion du fibrinogène du malade et l'effet essentiel est dû à une inhibition, par ces molécules pathologiques, de la coagulation des fibrinogènes normaux.

# C H A P I T R E  I I

## FIBRINOLYSE

# HISTORIQUE

La fibrinolyse est la liquéfaction enzymatique d'un caillot de fibrine ou d'un caillot sanguin, sous l'effet d'une enzyme (la plasmine) qui dérive d'un précurseur inactif (le plasminogène) présent dans la fraction globulinique du plasma. Pour la conversion du plasminogène en plasmine, un système activateur est nécessaire et c'est la découverte d'un activateur exogène (la streptokinase) qui a conditionné le développement de l'étude de la fibrinolyse, phénomène dont l'observation était pratiquement aussi ancienne que celle de la coagulation.

## LA "FIBRINOLYSE POST-MORTEM"

MORGAGNI(1761) puis HUNTER (1796) avaient noté que le sang restait fluide dans les cas de mort subite, HUNTER rapportant l'incoagulabilité du sang de deux cerfs tués lors d'une chasse à courre, première observation de l'effet fibrinolytique de l'exercice physique intense. Le rôle de la fibrinolyse dans le sang post-mortem a été démontré par MORAWITZ, en 1906, qui prouva qu'un tel sang ne contenait pas de fibrinogène et expliqua ce phénomène par l'hypothèse d'une digestion enzymatique du fibrinogène. YUDIN en trouva d'ailleurs une application pratique en créant, en 1936, un service de transfusion sanguine dont les "donneurs" étaient constitués par des sujets décédés de mort violente et dont le sang, de ce fait, pouvait être conservé sans anticoagulant.

Recherchant une relation entre la fibrinolyse post-mortem et le choc, MACFARLANE, en 1937, mit en évidence la lyse de caillots dilués obtenus à partir de patients ayant subi une intervention chirurgicale (92). Ceci serait une réponse à un stress plutôt psychique et non relié au traumatisme chirurgical, ce que confirme Von KAULLA (1947) en mettant en évidence l'effet obtenu simplement par les anesthésiques. La relation entre

l'activité fibrinolytique et les phénomènes de stress a été approfondie par MACFARLANE et son équipe (1947) qui ont mis en évidence la production d'une fibrinolyse par l'injection d'épinéphrine ou d'adrénaline (alors que ces produits sont sans effet in vitro).

L'étude de la fibrinolyse post-mortem a montré que le système fibrinolytique endogène est particulièrement puissant si l'on tient compte des doses massives de stimulants exogènes nécessaires pour provoquer une activité semblable. Ceci laisse supposer, en outre, l'existence d'un système inhibiteur non moins puissant car, chez les individus normaux, l'activité fibrinolytique spontanée est faible, sinon nulle, même si le potentiel fibrinolytique est présent.

## L'AUTO-DIGESTIBILITE DE LA FIBRINE

C'est DENIS qui publia le premier, en 1838, une observation décrivant l'auto-digestibilité de la fibrine : la fibrine obtenue à partir de sang dilué se dissout en 12 à 24 heures. GREEN redécouvrit ce phénomène en 1887 et indiqua qu'une fois la fibrine "dissoute", elle n'était plus coagulable par la thrombine.

DENYS et MARBAIX (1889) ont montré que le sérum traité par le chloroforme devenait protéolytique, résultat confirmé par DELEZENE et POZERSKI (1903) qui prouvèrent qu'un sérum de chien ainsi traité pouvait digérer la caséine et la gélatine.

DASTRE (39), créateur en 1889 du terme "fibrinolyse", montra que la fibrine se dissolvait spontanément au contact du sang de chiens ayant subi des hémorragies répétées. HEDIN (1904) puis OPIE et BARKER (1907) trouvèrent une activité protéolytique spontanée dans la fraction globulinique du plasma, ce qui permit de montrer que le facteur responsable de la fibrinolyse pouvait être concentré à partir des euglobulines.

LA "FIBRINOLYSE STREPTOCOCCIQUE"

En 1933, TILLETT et GARNER signalèrent que les filtrats de streptocoques hémolytiques provoquaient une liquéfaction rapide de la fibrine humaine et, alors que l'étude de la fibrinolyse avait été pratiquement abandonnée pendant une trentaine d'années, cette observation allait en relancer l'intérêt, en fournissant aux expérimentateurs un moyen commode pour provoquer la fibrinolyse et mettre en évidence les différentes variables qui interviennent. Ces auteurs attribuèrent la lyse observée à la production, par le streptocoque, d'une "fibrinolysine streptococcique". Néanmoins, MILSTONE (1941) montra que la fibrine obtenue à partir du fibrinogène purifié était insensible aux filtrats de streptocoques, mais que la lyse était obtenue par adjonction d'une faible quantité de globulines, mettant ainsi en évidence l'existence d'un "facteur lytique", lequel, d'après KAPLAN (1945) et CHRISTENSEN (36) est en fait un précurseur (le plasminogène) qui s'active, lors du traitement par le chloroforme ou la streptokinase du filtrat streptococcique, en une enzyme fibrinolytique, la plasmine.

Selon MULLERTZ et LASSEN (104), l'action de la streptokinase ne serait pas aussi simple, mais nécessiterait l'intermédiaire d'un "proactivateur" suivant le schéma :

Streptokinase + Proactivateur ⟶ Activateur

Activateur + Plasminogène ⟶ Plasmine

Parallèlement à la découverte de la streptokinase, un activateur fut mis en évidence dans l'urine. En fait, dès 1885, SAHLI avait décrit une enzyme urinaire présentant un effet "trypsine-like" sur la fibrine, mais le problème était resté en suspens à la suite de publications contradictoires, jusqu'à ce que MACFARLANE et PILLING aient confirmé, en 1947, la découverte de SAHLI. Il devint alors évident /WILLIAMS (1951), ASTRUP

et STERNDORFF(1952), SOBEL et coll. (1952)7, que l'activité fibrinolytique urinaire était le fait d'un activateur du plasminogène, l'urokinase. De la même façon, on a pu mettre en évidence des activateurs dans la plupart des sécrétions et des tissus de l'organisme /ÄSTRUP (12)7, ce qui montre la quasi-ubiquité du système fibrinolytique de l'organisme et laisse supposer son importance physiologique.

# FACTEURS DE LA FIBRINOLYSE

## LE SYSTEME PLASMINOGENE-PLASMINE

Le plasminogène est une β-globuline /ROBBINS et SUMMARIA (130)/ que l'on trouve dans la fraction euglobulinique du plasma /MILSTONE (1941)/. Par immunofluorescence, BARNHART et RIDDLE (18) ont montré que sa synthèse était effectuée au niveau des éosinophiles de la moelle osseuse qui en assuraient le transport vers le sang et les tissus. Mais, dans des travaux plus récents, PROKOPOWICZ (122-123-124) a mis en évidence la présence de plasminogène au niveau de tous les granulocytes et monocytes. Il précise, par ailleurs (125), que l'enzyme apparaît dans les promyélocytes pour manifester son activité maximale dans les métamyélocytes, celle-ci décroissant ensuite au cours de la maturation. Il indique, en outre, qu'il n'y a pas de différence significative entre le contenu en plasminogène des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles, mais que les mégacaryocytes, les érythroblastes, les érythrocytes et les lymphocytes ne recèlent aucune activité fibrinolytique.

Le poids moléculaire du plasminogène avait été déterminé par SHULMAN, en 1958, (141) comme étant de l'ordre de 143 000, mais les déterminations les plus récentes proposent une valeur beaucoup moins élevée, du fait d'une meilleure purification de la protéine : 83 000 /DAVIES et ENGLERT (1960)/ et 81 000 ± 2 900 /BARLOW et coll. (16)/. Ces derniers auteurs attribuent à la plasmine un poids moléculaire de 75 400 ± 2 800, qui est significativement différent du poids moléculaire de son précurseur, et interprètent cette différence par la libération d'un polypeptide au cours de l'activation du plasminogène. Ce résultat avait déjà été obtenu par TAYLOR et BOTTS (149), qui avaient isolé un polypeptide de poids moléculaire 6 200 ± 1 000 après action de la streptokinase sur le plasminogène en présence de glycérol. Toutefois, d'après ROBBINS et SUMMARIA (1967), le plasminogène et la plasmine auraient un poids moléculaire semblable (89 000 ± 1 500), et donc les peptides éventuellement libérés par l'action de la streptokinase ou de l'urokinase ne pourraient avoir un poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 4 000.

L'obtention d'un plasminogène purifié est difficile et l'immunoélectrophorèse met en évidence l'existence de divers contaminants (128), mais montre en outre la similitude antigénique du plasminogène et de la plasmine, néanmoins des travaux récents /IONESCO-STOIAN et ISTRATI (68)/ signalent la purification par chromatographie sur colonne d'un plasminogène immunologiquement homogène. Le plasminogène présente une affinité importante pour le fibrinogène et la fibrine. S'il existe des préparations de plasminogène dépourvues de fibrinogène, on n'a pu préparer de fibrinogène exempt de plasminogène, mais on peut essayer de l'éliminer en tirant parti de sa labilité à la chaleur : il est en effet détruit par 30 minutes de chauffage à 70°C /LASSEN (78)/.

La plasmine est l'enzyme qui dérive du plasminogène soumis à divers processus d'activation. C'est l'enzyme responsable du phénomène de fibrinolyse, mais elle présente aussi une activité protéolytique à l'égard de divers substrats, dont le fibrinogène, la gélatine et la caséine, et une activité estérasique sur des substances synthétiques (BAMe, LEe) ; cette activité se manifeste quand la plasmine est obtenue par activation in vitro par la streptokinase mais non par l'urokinase /SCHULTZ et Von KAULLA (133)/, ce qui a posé le problème de l'existence de plusieurs formes de plasmine. Il a néanmoins été prouvé que le sang de patients présentant une activité fibrinolytique importante est sans activité estérasique sur les substrats synthétiques /SCHULTZ et coll. (134)/. Ceci montre que l'activation du système fibrinolytique humain dans le plasma, par les activateurs naturels, provoque l'apparition d'une activité fibrinolytique mais non estérasique. Par contre, l'activation par la streptokinase, qui est non physiologique, a pour résultat l'apparition d'une activité estérasique, elle-même non physiologique /Von KAULLA (70)/.

## ACTIVATEURS, INHIBITEURS

### Activateurs

Les activateurs sont des substances d'origine exogène ou endogène qui permettent la conversion du plasminogène en plasmine.

a) Activateurs non physiologiques

Le plus employé est la streptokinase, protéine de poids moléculaire voisin de 50 000 /TAYLOR et BOTTS (149), BILINSKI et coll. (23), MORGAN et HENSCHEN (103)/. produite par des streptocoques β-hémolytiques, le groupe C étant usuellement choisi pour les préparations commerciales. La molécule de streptokinase présente une structure interne enroulée, mais cette conformation ne montre aucune hélicité notable /LOCH et coll. (86), TAYLOR et BOTTS (149)/. D'autres activateurs microbiens ont été étudiés à un degré moindre, comme la staphylokinase (LEWIS et FERGUSON), la pronase, extraite de cultures de Streptomyces Griseus, et l'activateur de l'Aspergillus Oryzae (Protéase I ou CA7).

De plus, le chloroforme et d'autres solvants organiques (tels l'acétone et divers alcools) ont été utilisés pour induire une activité fibrinolytique dans le plasma ou le sérum. Celle-ci serait due à l'activation autocatalytique du plasminogène après élimination des inhibiteurs par ces composés.

b) Activateurs physiologiques

Ces activateurs physiologiques de la formation de la plasmine peuvent être classés, comme les activateurs de la formation de la thrombine, en activateurs intrinsèques (sanguins) et extrinsèques (tissulaires).

L'activateur sanguin (ou les activateurs sanguins) est l'élément le moins clairement défini du système fibrinolytique. Il existe un activateur du

fibrinogène dans le sang normal, non fibrinolytique, en l'absence de streptokinase /VON KAULLA (70)/. Peut-être existe-t-il sous forme d'un précurseur inactif, et se manifeste-t-il sous l'effet d'un stimulus qui déclenche l'activation du système fibrinolytique endogène, comme c'est le cas du stress, de l'exercice physique, du choc ou de la grossesse /NILSSON et KULLANDER (110)/. Les euglobulines du plasma sont une source d'activateur sanguin, comme l'ont montré les travaux de LEWIS et FERGUSSON en 1951 et ceux de SHERRY et de ses collaborateurs en 1959. MULLERTZ, en 1953, a mis cet activateur en évidence chez des individus manifestant une fibrinolyse accrue après traitement aux électrochocs ou après mort subite. D'après FEARNLEY (51) et son école, la mise en évidence de l'activateur sanguin chez des sujets normaux suppose que le sang est conservé à basse température entre le prélèvement et le dosage de l'activité fibrinolytique, car l'activateur sanguin est très labile et rapidement détruit à température ambiante. Pour cet auteur, l'activateur sanguin est libéré par l'intima des veines, cette libération étant potentialisée par l'occlusion veineuse ou par un traumatisme portant sur la paroi veineuse. Certains auteurs ont effectué la recherche d'activateurs dans les éléments figurés du sang : en particulier, SEMAR et coll. (139) mettent en évidence une "érythrokinase" dans les globules rouges.

ASTRUP et STAGE (1952) ont mis en évidence des activateurs du plasminogène dans de nombreux tissus et ont décrit un procédé qui permet de les isoler, par une extraction au thiocyanate de potassium suivie d'une précipitation en milieu acide. ALBRECHTSEN (8) a étudié le contenu en activateur de divers tissus humains et a montré que les organes les plus riches étaient l'utérus, les surrénales, les ganglions lymphatiques, la prostate et les poumons. Le foie, contrairement aux autres organes, en est complètement dépourvu. On trouve aussi des activateurs du plasminogène au niveau de l'endothélium vasculaire /PECHET (118)/ et dans divers fluides de l'organisme, comme le lait, les larmes, la salive, le sperme /ASTRUP et coll. (13)/, le liquide amniotique /ALBRECHTSEN (8)/ et la bile /OSHIBA et coll. (117)/.

Une activité fibrinolytique a été mise en évidence dans l'urine par MACFARLANE et PILLING en 1947 puis par WILLIAMS en 1951. Cette activité est due à la présence d'un activateur nommé urokinase par SOBEL et ses collaborateurs (1952). Les premières préparations d'urokinase étaient souillées par divers contaminants, essentiellement l'uropepsine, responsable d'une chute de l'activité fibrinolytique, une antitrypsine dont la présence peut constituer une source d'erreur dans le dosage de l'urokinase et des substances "thromboplastiques". Néanmoins, des procédés de purification de l'urokinase ont été mis au point : on peut procéder par adsorption sur gel de silice suivie d'une élution à l'ammoniaque et passage sur résine échangeuse d'ions /PLOUG et KJELDGAARD (120)/ ou chromatographie sur colonne d'acide silicique et précipitation au sulfate d'ammonium de l'éluat /CELANDER et GUEST (33)/.

L'urokinase pure est une protéine incolore et thermostable : elle n'est pas dénaturée à 50°C pour des pH variant de 1 à 10 et, à plus haute température, on observe une meilleure stabilité à pH acide /Von KAULLA (70)/, alors que, dans l'urine, elle s'inactive rapidement malgré l'acidité, sans doute sous l'effet de l'uropepsine.

La détermination du poids moléculaire de l'urokinase est récente et a fait l'objet de publications contradictoires : en 1965, LESUK et ses collaborateurs décrivirent un procédé de cristallisation de l'urokinase qui fournissait un cristal apparemment homogène et indiquèrent un poids moléculaire de 54 000 ; l'année suivante, WHITE, sur une préparation d'activité semblable, montra l'existence de trois types de molécules, de poids différents (31 500 et 54 000 pour les deux principales). Des travaux plus récents de l'équipe de LESUK (82) confirment la valeur de 54 000, qui semble désormais admise (72-75-158).

Une certaine corrélation entre l'activité fibrinolytique plasmatique et l'excrétion d'urokinase avait été observée après exercice physique /CELANDER

et GUEST (33)7 ou dans certains états pathologiques /SMYRNIOTIS et coll. (1958)7. Ceci avait suggéré que l'urokinase était la forme d'excrétion rénale de l'activateur sanguin. Mais DUDOK de WIT (46) indique que l'augmentation du taux d'activateur plasmatique, provoquée par certaines drogues, ne s'accompagne pas d'un accroissement de la sécrétion d'urokinase. Il montre en outre que l'activateur sanguin ne peut neutraliser les inhibiteurs plasmatiques de l'urokinase. De toute façon, l'urokinase, du point de vue immunologique, diffère de l'activateur que l'on trouve dans le sang ou le lait (75).

Dans les thérapeutiques fibrinolytiques, l'urokinase humaine présente moins de risques de toxicité que la streptokinase et a l'avantage de ne pas être antigénique sauf si elle est employée chez l'animal /CELANDER et GUEST (33)7, car l'urokinase humaine est immunologiquement différente des urokinases animales /KUCINSKI et coll. (75)7.

Inhibiteurs

Les inhibiteurs de la fibrinolyse sont des substances endogènes ou exogènes qui s'opposent à l'action de la plasmine ou du plasminogène.

a) Inhibiteurs exogènes

Les inhibiteurs exogènes de l'activité fibrinolytique sont des substances qui ont joué un rôle important d'abord dans la thérapeutique des hémorragies cataclysmiques du post-partum ou du post-abortum, puis leur application s'est étendue au domaine chirurgical, en particulier pour le contrôle des opérations à coeur ouvert avec circulation extra-corporelle (109), et au domaine médical /cirrhoses, cancer (47)7.

On distingue deux grandes catégories d'inhibiteurs exogènes de la fibrinolyse :

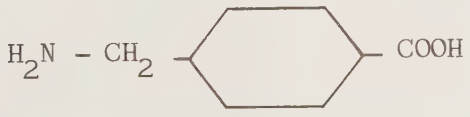
- les inhibiteurs de la plasmine qui sont aussi des antitrypsines, tels l'inhibiteur de FREY, extrait de la glande parotide de boeuf et l'inhibiteur de KUNITZ obtenu à partir du pancréas de boeuf, l'antitrypsine du soja. THORSEN et ASTRUP (151) mentionnent une antitrypsine urinaire et une antitrypsine extraite de l'arachide. L'inhibiteur de KUNITZ est un polypeptide, de poids moléculaire 6 000 environ, et dont la structure est connue depuis la détermination des 58 acides aminés qui le composent. Il inhibe la trypsine, la chymotrypsine et la plasmine, tout comme l'inhibiteur de FREY qui présente une structure semblable (composé de 58 acides aminés) mais agit aussi sur la pepsine et la kallicréine, ce dernier effet servant de base à son dosage. D'autres antitrypsines, présentant une activité antiplasmine, ont été isolées dans le poumon (pulmine) ou dans l'urine (mingine) ;

- les inhibiteurs de la conversion du plasminogène en plasmine (anti-activateurs) sont des substances synthétiques, manifestant à un degré moindre une activité antiplasmine.

L'acide $\varepsilon$-aminocaproïque, découvert en 1952 par OKAMOTO, est un solide cristallisé, soluble dans l'eau, de point de fusion 202°C ; ce composé a un poids moléculaire de 131 et répond à la formule :

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$$

L'activité antifibrinolytique nécessitant, d'après YOKOI (160), la présence de 5 groupements méthylène entre un radical aminé et un radical carboxylique, les travaux de l'école japonaise se sont poursuivis par la synthèse, en 1962, de l'acide 1-amino méthyl cyclohexane 4 carboxylique ou AMCHA /ŌKAMOTO et OKAMOTO (115)/.



Cette formule laisse supposer l'existence de stéréoisomères quant à la disposition spatiale des groupes COOH et $NH_2$ par rapport au cyclohexane ; la forme trans, pour laquelle le noyau cyclohexane est dans la configuration "chaise" est plus nettement active que la forme cis qui correspond à une configuration "bateau" /ŌKAMOTO et coll. (116), SHIMIZU et coll. (140)/.

Un homologue non saturé de l'AMCHA a été synthétisé par LOHMANN, MARKWARD et LANDMANN en 1963 ; c'est l'acide para-aminométhylbenzoïque (PAMBA), qui a la même structure que l'AMCHA, si l'on remplace le cyclohexane par un cycle benzénique.

L'efficacité de l'AMCHA est nettement supérieure à celle de l'acide ε-aminocaproïque, mais semblable à celle du PAMBA /DONNER et HOUSKOVA (45)/.

b) Inhibiteurs endogènes

Nous pouvons dresser une classification des inhibiteurs endogènes semblable à celle des inhibiteurs exogènes, c'est-à-dire suivant leur mode d'action, et distinguer des anti-activateurs et des antiplasmines. Il existe vraisemblablement, dans le système sanguin normal, des inhibiteurs de la conversion du plasminogène en plasmine, tout comme il existe des inhibiteurs de la transformation de la prothrombine en thrombine, mais leur mise en évidence n'est pas certaine. Toutefois, au cours des traitements thrombolytiques par la streptokinase, l'apparition d'anticorps antistreptokinase est reconnue et ce sont les seuls anti-activateurs décrits dans le système sanguin. L'existence

d'anti-activateurs tissulaires, hypothèse de MACFARLANE et BIGGS en 1948, a été confirmée en 1968 par KAWANO et coll. (71) avec la mise en évidence, dans le placenta, de quantités importantes d'un inhibiteur de l'urokinase.

Les antiplasmines ont fait l'objet de nombreux travaux dont NORMAN (111) explique la discordance en mettant en évidence deux types d'inhibition de la plasmine, correspondant à une antiplasmine immédiate et à une antiplasmine progressive. Pour cet auteur, l'antiplasmine à action rapide, qui migre avec les $\alpha_2$-globulines, provoque une inhibition réversible, alors que l'antiplasmine à action lente, de poids moléculaire 54 000, qui migre avec les $\alpha_1$-globulines provoque une inhibition irréversible et progressive de la plasmine. L'antiplasmine progressive est identique à l'$\alpha_1$-antitrypsine, mais son inhibition de la trypsine et de la chymotrypsine est instantanée, contrairement à celle de la plasmine /RIMON et coll. (129)/. L'antiplasmine immédiate est l'$\alpha_2$-macroglobuline, d'un poids moléculaire d'environ 800 000, étudiée particulièrement par GANROT (53-54-55-56) et STEINBUCH et coll. (144-145-146). Elle manifeste aussi une action antithrombine progressive, que nous avons déjà mentionnée, et cette ambivalence en fait un lien entre les phénomènes de coagulation et de fibrinolyse. GANROT considère que l'$\alpha_2$-M inhibe la plasmine de façon immédiate en constituant un complexe inactif, alors que, pour STEINBUCH, cette inactivation est rapide (quelques minutes) mais non immédiate.

Un autre élément jouant un rôle dans chacun des aspects de la "balance hémostatique" est le calcium, dont l'action a été controversée en raison des tests mis en oeuvre par les différents auteurs. RATNOFF (1952) mit en évidence une accélération du temps de lyse des euglobulines par le calcium, alors que FEARNLEY et TWEED (1953) observèrent une inhibition de la lyse du caillot plasmatique dilué en présence de $Ca^{++}$. Ces deux phénomènes ont été confirmés par BRUCE (29), qui explique que le calcium renforce l'effet des

inhibiteurs (en particulier des antiplasmines), ce qui justifie les phénomènes observés lors des tests effectués sur du plasma ou sur du sang (dilué ou non) ; en l'absence d'inhibiteurs, le calcium agit sur les activateurs (ou sur la plasmine), ce qui provoque une accélération du temps de lyse des euglobulines.

# DYNAMIQUE DU SYSTEME FIBRINOLYTIQUE

## ACTIVATION DU PLASMINOGENE EN PLASMINE

La transformation du plasminogène en plasmine, qu'elle se produise autocatalytiquement, après destruction des inhibiteurs, ou sous l'effet d'un activateur, correspond, selon ROBBINS et ses collaborateurs (1967), à un simple remaniement de la molécule sans changement significatif de la structure primaire, en ce sens que la molécule de plasmine est un peu plus compacte que la molécule de plasminogène. Selon ces auteurs, l'activation correspondrait à la rupture d'une seule liaison arginine-valine (figure 11). Remarquons que l'hypothèse d'un tel mécanisme par ouverture d'une liaison arginine avait déjà été avancée par ALKJAERSIG et coll. en 1958 (9).

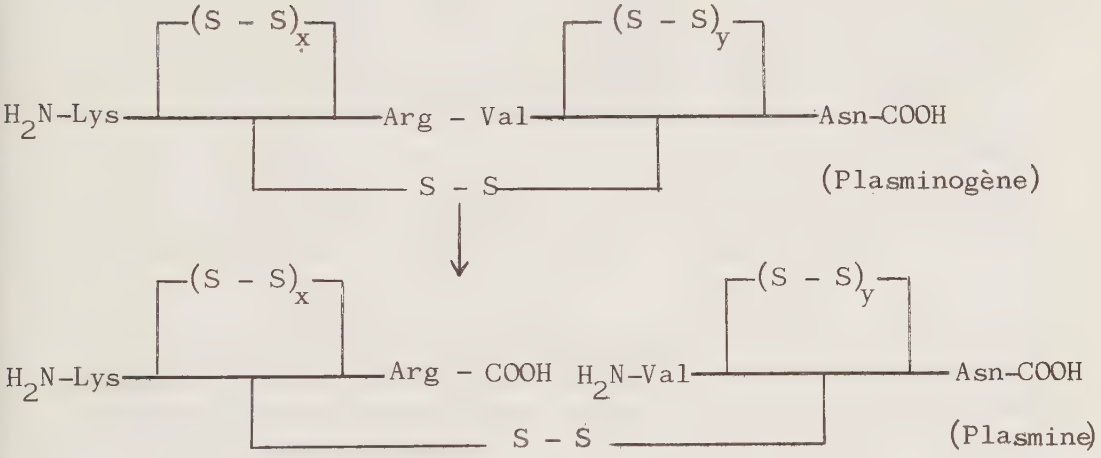



Figure 11

TRANSFORMATION DU PLASMINOGENE EN PLASMINE

Ainsi, lors de l'activation, il n'y aurait pas destruction de parties importantes de la molécule, donc on ne devrait trouver aucune différence de poids moléculaire ni de composition en acides aminés entre le plasminogène et la plasmine, ce qui est confirmé par les résultats expérimentaux de ROBBINS et coll. (1967), que l'activation soit effectuée en présence de streptokinase ou d'urokinase.

S'il est connu que l'activation du plasminogène par l'urokinase se produit de façon directe, le mécanisme d'action de la streptokinase reste obscur. MULLERTZ et LASSEN (1953) avaient constaté que le plasminogène humain, sous l'influence de la streptokinase, s'activait très vite, alors que l'activation du plasminogène bovin était très lente, mais accélérée par l'addition d'une petite quantité de sérum humain ou d'euglobulines humaines. Ceci fut expliqué, par MULLERTZ, LASSEN et ASTRUP, par l'existence, dans le sang humain, de deux facteurs de la fibrinolyse, le plasminogène et le "proactivateur" ; d'après ces auteurs, le proactivateur (inactif), sous l'action de la streptokinase, se transformerait en activateur (actif), celui-ci transformant le plasminogène en plasmine, suivant le schéma :

Streptokinase + Proactivateur humain → Activateur

Activateur + Plasminogène bovin ⟶ Plasmine

De nombreux travaux ont été effectués pour confirmer l'hypothèse de MULLERTZ et LASSEN et résoudre le problème de la dualité plasminogène-proactivateur. Ces recherches ont été infructueuses dans la mesure où il n'a pas été possible d'isoler et d'identifier le proactivateur, ni de préparer du plasminogène exempt "d'activité-proactivateur". De ce fait, il a été considéré que le proactivateur n'était pas une entité propre et qu'il était identique au plasminogène ou à la plasmine : en effet, l'addition de streptokinase à la plasmine lui fait perdre son pouvoir fibrinolytique et fait apparaître un pouvoir activateur /KLINE et FISHMAN (1961)/. C'est aussi le cas lors de l'addition de

streptokinase au plasminogène, ce qui indique que ces deux produits se comportent en proactivateurs /GUTMAN et RIMON (61)/, les activateurs auxquels ils donnent naissance étant identiques /BUCK et coll. (30)/.

Il est ensuite naturellement apparu que des complexes activateurs streptokinase-plasminogène se formaient stoechiométriquement dans le cas de certains plasminogènes, par exemple chez l'homme et le singe Rhésus, mais non chez le boeuf et le mouton /DOLESCHEL et AUERSWALD (44)/. Il en est de même avec la plasmine ; les complexes streptokinase-plasmine et streptokinase-plasminogène, qui ont été isolés, correspondent à une addition molécule à molécule et agiraient sur le plasminogène de façon semblable à l'urokinase /SCHWICK et HEIMBURGER (135)/. Les conditions expérimentales déterminent, dans une grande mesure, la nature des complexes formés. En effet, TS'AO et KLINE (155), utilisant de la streptokinase et du plasminogène dans un rapport molaire de 4 à 1 mais à un degré de pureté peu élevé, considèrent que le complexe streptokinase-plasminogène n'est que transitoire, l'activateur réel étant un complexe streptokinase-plasmine ; SUMMARIA et coll. (148) utilisent des réactifs mieux purifiés dans un rapport molaire de 1 à 1. Ils indiquent que le complexe formé à 0°C est de la forme plasminogène-streptokinase, alors qu'à 25°C, c'est la forme plasmine-streptokinase qui prédomine. Toutefois, ces derniers auteurs (147), tout comme MURAMATU et coll. (105), montrent que l'activité proactivateur du plasminogène se manifeste pour de fortes doses de streptokinase (par l'intermédiaire de la formation de complexes) alors que, pour des concentrations très faibles de streptokinase, c'est une activation directe du plasminogène en plasmine qui a lieu : le phénomène se produit alors de la même façon qu'avec l'urokinase, c'est-à-dire par l'ouverture d'une liaison arginine-valine.

Si les phénomènes qui se produisent lors de l'activation commencent à être élucidés, remarquons que le mécanisme intime de l'action des inhibiteurs physiologiques ou thérapeutiques n'a pas été décrit et que l'origine de l'inhibition reste inconnue.

## FIBRINOLYSE ET FIBRINOGENOLYSE

L'action prolongée de la plasmine sur le fibrinogène ou sur la fibrine donne naissance à des produits de dégradation résultant de son activité protéolytique. La dégradation in vitro du fibrinogène avait été observée par VIRCHOW, dès 1845, et par HAMMARSTEN, en 1880, qui ont mis en évidence la perte de coagulabilité du fibrinogène au cours de sa conservation. En 1934, GARNER et TILLET (57) montrèrent que, par action de la streptokinase, le fibrinogène devient moins coagulable. Ceci a été confirmé par NIEWAROWSKI et KOWALSKI (108) qui ont indiqué que l'incubation du fibrinogène ou de la fibrine avec la trypsine, la plasmine ou la streptokinase fait apparaître des produits de dégradation dont l'activité anticoagulante dépend de la durée d'incubation, au moins au début. Elle est fonction de la concentration du fibrinogène, mais non de la plasmine.

Diverses études des produits de dégradation ont cherché à identifier ces fragments : SEEGERS (138) isola à l'électrophorèse deux fractions, l'une thermolabile ("fibrinogène $\alpha$"), l'autre thermostable ("fibrinogène $\beta$"), obtenues après dégradation spontanée. SALMON (131) détermina des différences entre le fibrinogène et ses produits de dégradation par la streptokinase au moyen de techniques immunologiques, en précisant en outre que la lyse de la fibrine par la plasmine fait réapparaître les caractères antigéniques de la fibrine alors qu'ils sont masqués du fait de la polymérisation. NUSSENZWEIG et ses collaborateurs (112-113) ont séparé, par chromatographie, les produits obtenus après action prolongée de la plasmine

sur le fibrinogène et ont défini 5 fractions : A, B, C, D, E, parmi lesquelles D et E sont porteuses du caractère antigénique alors que A, B, C en sont dépourvues. Les poids moléculaires de D et E sont évalués respectivement à 83 000 et 35 000.

L'effet anticoagulant des produits de dégradation a été particulièrement étudié : LATALLO et coll. (81) montrent d'abord que le phénomène essentiel est une inhibition de la polymérisation par le "split" D qui s'incorpore au réseau de fibrine, donnant ainsi au caillot une structure anormale, dont la désorganisation, semblable à celle observée en présence de dextran /RABY et BERTRAND (127)/, est mise en évidence en microscopie électronique /BANG et coll. (15)/. Cette technique permet de visualiser, sur les caillots défectueux, une structure très lâche, présentant des agrégats stellaires aux points de jonction des fibres, et montre une allure effilochée des fibres à leur extrémité non reliée au réseau. L'incorporation du fragment D dans la fibrine est justifiée par le fait que ces défauts sont d'autant plus prononcés que ce produit est plus concentré. Il se lie aux monomères de fibrine, masquant ainsi les sites nécessaires à une polymérisation normale, et ce mécanisme traduit une inhibition compétitive de cette polymérisation. Dans une étude plus récente, LATALLO et ses collaborateurs (79) distinguent l'effet proprement antithrombine des produits précoces de la dégradation du fibrinogène par la plasmine et l'effet antipolymérase des produits tardifs.

Les travaux de LARRIEU et coll. (76-77) décrivent la dégradation par la plasmine et la streptokinase, ainsi que l'action des produits obtenus sur la fibrinoformation et sur les fonctions plaquettaires. Dès dix minutes d'incubation, on peut distinguer quatre fragments : X (thermolabile) et A, B, C (thermostables). Après trente minutes, X a disparu alors que sont apparues les fractions D, Y (thermolabiles) et E (thermostable), D et E restant seules après une incubation prolongée.

Les fragments B et C sont sans action sur la fibrinoformation, alors que les autres, A, D, E et Y, prolongent le temps de thrombine du plasma, cet effet étant le plus marqué pour le fragment Y, responsable du pic d'activité des produits précoces ; le split E se révèle, en outre, inhibiteur dans les tests de génération de thromboplastine, mais seul le fragment D est inhibiteur de la polymérisation de la fibrine.

Les produits de dégradation du fibrinogène inhibent l'agrégation plaquettaire sans que l'on puisse attribuer cet effet à l'un des fragments puisque chacun d'eux, pris isolément, est inefficace. Ceci pourrait conduire à attribuer cet effet aux fragments de faible poids moléculaire décrits par TRIANTAPHYLLOPOULOS (153-154), qui indique que si la plasmine dégrade le fibrinogène, comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de dénombrer au moins 27 peptides de poids moléculaire beaucoup plus faible, solubles dans le surnageant, à pH acide. Toutefois, en ce qui concerne l'agrégabilité plaquettaire, il convient de tenir compte des difficultés expérimentales que l'on rencontre dans l'étude de ce phénomène si les conditions du test sont mal définies, et, en particulier, de l'incidence du pH sur l'agrégation. C'est ainsi qu'il a été décrit, successivement, que les produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine avaient un effet nul /HIRSH et coll. (67)/, un effet inhibiteur /LARRIEU et coll. (76)/, et un effet activateur sur l'agrégation (McNICOL et coll. (94)/.

Le pouvoir anticoagulant des produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine a été mis en évidence par de nombreux auteurs /LEWIS et WILSON (83), FLETCHER et coll. (52), NANNINGA et GUEST (106), GORMSEN et LAURSEN (60), MILLER et SANCHEZ-AVALOS (101), TRIANTAPHYLLOPOULOS (152)/ mais le mécanisme d'action est mal connu. Il faut toutefois signaler que le même effet peut s'observer en présence du fibrinogène lui-même, qui est inhibiteur de la polymérisation des monomères de fibrine si la force ionique du milieu est suffisante /BELITSER et coll. (20)/, ce qui laisse supposer que le fragment D, inhibiteur de la structuration du caillot, possède, au moins, un des sites

responsables de la polymérisation des monomères de fibrine, mais aussi un élément inhibiteur (charge électrique, absence d'un site nécessaire...). C'est aussi le cas du fibrinogène, pour lequel l'électronégativité des fibrinopeptides suffit à empêcher l'agrégation (sauf dans des milieux de force ionique importante où cet effet électrostatique peut s'annuler et où le fibrinogène peut exister sous forme d'un gel semblable à la fibrine). Un phénomène analogue s'observe avec le premier produit de la dégradation du fibrinogène par la plasmine, de poids moléculaire 265 000 (fragment X) : la différence la plus notable entre ce fragment et le fibrinogène original réside dans le coefficient de diffusion et elle traduit une réduction importante du rapport axial de la molécule de fibrinogène. Le fragment X peut coaguler à 100 % sous l'action de la thrombine, toutefois, cette coagulation est lente, car le changement de conformation moléculaire rend difficile la polymérisation, les sites actifs ne pouvant réaliser une configuration satisfaisante /FLETCHER et coll. (52)/.

La comparaison des produits de dégradation obtenus à partir du fibrinogène et de la fibrine est difficile car la plupart des auteurs donnent à ces produits une définition temporelle, en les caractérisant par le temps d'incubation qui permet de les obtenir, sans tenir compte de la dose utilisée en plasmine ou en activateur. D'ailleurs, la comparaison effectuée, à temps d'incubation égal, entre les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine n'est pas très légitime, car elle ne tient pas compte de la dépolymérisation du caillot de fibrine qui est une étape nécessaire avant la protéolyse, par la plasmine, des monomères de fibrine. C'est avec une telle comparaison que GORMSEN et LAURSEN (60) indiquent que les produits de fibrinolyse sont moins anticoagulants que les produits de fibrinogénolyse, aussi bien après 5 minutes que 90 minutes d'incubation en présence de plasmine. Par contre, LEWIS et WILSON (83) ne trouvent aucun effet anticoagulant aux produits de fibrinolyse et montrent la similitude immunoélectrophorétique des fragments D et E issus du fibrinogène ou de la

fibrine. SANCHEZ-AVALOS et MILLER (132) indiquent que si les fragments D et E du fibrinogène et de la fibrine sont immunologiquement semblables, les mobilités électrophorétiques des fragments E sont différentes : c'est le fragment E de la fibrine qui est le plus rapide, ce qui laisse supposer que le fragment E du fibrinogène contient un fibrinopeptide A ou B, ce qui le différencierait du fragment E de la fibrine.

Une autre propriété des produits de dégradation du fibrinogène contribue à préciser leur rôle à l'égard des phénomènes de coagulation et de fibrinolyse : NANNINGA et GUEST (107) ont montré que le fragment D, s'il présente des propriétés anticoagulantes, est aussi un inhibiteur de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse ; d'après ces auteurs, cet effet serait dû à la formation d'un complexe avec la plasmine.

## MECANISME PHYSIOLOGIQUE DE LA FIBRINOLYSE

La présence, dans le sérum de sujets normaux, de produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine /à des concentrations d'environ 4 mg/l, d'après DAS et coll. (38)/, dont l'élimination par le foie est rapide /3 heures d'après BARNHART et CRESS (17)/, est en faveur de l'hypothèse de SALMON (1961) qui suppose que la fibrinolyse se produit de façon continuelle dans le système circulatoire. La brève durée de vie des facteurs de coagulation, si l'on compare avec celle des autres protéines, indique que, de la même façon, il existe chez l'individu normal un processus physiologique de coagulation intravasculaire et il faut donc supposer que la fibrinolyse physiologique a pour effet d'éliminer les dépôts intravasculaires de fibrine ; ceci suppose un parfait équilibre entre le dépôt sur l'endothélium vasculaire et l'élimination fibrinolytique du dépôt, et montre l'importance physiologique du processus de fibrinolyse, dont le mécanisme intime reste encore inexpliqué.

L'interprétation du phénomène physiologique est délicate en raison de quelques paradoxes qui, en fait, constituent les éléments qui doivent permettre d'expliquer le mécanisme de la fibrinolyse :

- le taux d'antiplasmines circulantes est suffisamment élevé pour neutraliser largement l'activité fibrinolytique correspondant au contenu en plasminogène du système sanguin ;

- la fibrinolyse est un processus physiologique continuel, mais le fibrinogène n'est pas dégradé (sauf dans des conditions pathologiques) ;

- la lyse des caillots de fibrine peut se produire dans un plasma sans que l'on puisse y détecter de plasmine /ĀBLONDI et De RENZO (1959)/.

Compte tenu de ces aspects particuliers, deux modèles ont été élaborés pour décrire le mécanisme de la fibrinolyse naturelle, le premier par FEARNLEY (1953) dont s'est inspiré SHERRY (1959), et le second par AMBRUS (1962). Pour AMBRUS, la source essentielle de l'activité fibrinolytique est, dans le sang circulant, le complexe plasmine-antiplasmine immédiate (11) ; ce complexe se dissocie en présence de fibrine qui présente plus d'affinité pour la plasmine que son inhibiteur ; ainsi, la lyse du caillot peut avoir lieu sans que le sang circulant contienne de plasmine libre et sans que l'activité fibrinolytique conduise à une protéolyse du fibrinogène. Les modèles de FEARNLEY et de SHERRY prennent comme hypothèse de base l'absorption de plasminogène par le caillot au moment de sa formation. Ce plasminogène intrinsèque se transforme en plasmine sous l'effet d'activateurs qu'apporte le flux sanguin (pour un thrombus non occlusif) ou d'activateurs provenant de la paroi vasculaire elle-même et la plasmine ainsi formée lyse le caillot. Pour FEARNLEY, l'activateur s'adsorbe sur la fibrine, de sorte que la lyse du caillot, sous l'effet de la plasmine, procède de l'extérieur vers l'intérieur, alors que,pour SHERRY, l'activateur diffuse dans la structure fibrineuse et le phénomène de lyse se propage de l'intérieur vers l'extérieur. Dans

ce modèle, l'activation du plasminogène circulant ne fournit pas de plasmine décelable, car elle est aussitôt inactivée par les antiplasmines du sérum, ce qui, en outre, empêche la protéolyse du fibrinogène. Le mécanisme de la fibrinolyse par adsorption pourrait d'ailleurs faire jouer un rôle aux érythrocytes, qui sont incorporés dans le caillot, soit dans l'activation du plasminogène par l'intermédiaire de leur "érythrokinase", soit dans la protection des substances fibrinolytiques contre les inhibiteurs, d'après des observations de KOLMEN (1959). L'adsorption sélective de l'activateur sanguin se ferait, suivant MULLERTZ (1957), d'une façon semblable à l'adsorption de la plasmine dans le modèle d'AMBRUS, au niveau de la fibrine, par la dissociation d'un complexe activateur-anti-activateur, ce qui permet, en raison de la circulation du sang autour du thrombus, l'accumulation de l'activateur, lequel, du fait de sa concentration localement élevée, déclenche la lyse du caillot, bien que la concentration en activateur du sang circulant soit faible.

Des travaux plus récents /ŌGSTON et coll. (114), HEDNER et NILSSON (64)/ ont permis de montrer que le plasma et le sérum ne différaient pas significativement en ce qui concerne leur concentration en plasminogène, ce que confirme le dosage direct du plasminogène dans un caillot de fibrine. La quantité de plasminogène présent sur la fibrine est très faible, ce qui laisse supposer que le plasminogène s'élimine des caillots pendant l'exsudation du sérum et que la faible concentration observée correspond au plasminogène "piégé" dans la structure fibrineuse. Ces résultats expérimentaux permettent de réfuter l'hypothèse de la "fibrinolyse intrinsèque" suivant FEARNLEY ou SHERRY, puisque les caillots de fibrine ne contiennent pratiquement pas de plasminogène. Mais OGSTON précise, par ailleurs, qu'en présence de plasma, l'urokinase transforme le plasminogène plasmatique en plasmine, mais que la lyse du caillot ne peut avoir lieu du fait de la neutralisation de la plasmine par l'antiplasmine sérique : ces travaux montrent aussi l'insuffisance du modèle d'AMBRUS, puisque la capacité de la fibrine à

dissocier le complexe plasmine-antiplasmine ne semble pas assez efficace. Ceci rejoint l'hypothèse formulée par DUDOK de WIT (1962), qui suggère que le plasminogène et l'activateur circulants s'adsorbent sur les fibres de fibrine après la formation du caillot, de sorte que la plasmine engendrée peut lyser la fibrine sans entrer en contact avec le système inhibiteur.

Remarquons que la lyse des caillots commence nécessairement par la dépolymérisation de la fibrine et que l'apparition de produits de dégradation est un phénomène beaucoup plus tardif, qui n'a pas nécessairement totalement lieu dans les circonstances physiologiques puisque, la dépolymérisation effectuée, la plasmine est libérée dans le courant sanguin où elle peut à nouveau être inactivée par ses inhibiteurs. Dans l'étude de la fibrinolyse par la technique du caillot standard, tel que nous l'utilisons pour définir la cinétique (40), le temps de lyse que nous déterminons correspond au retour du contenu du tube à l'état fluide, c'est-à-dire à la dépolymérisation et l'étude immunoélectrophorétique montre que, dans nos conditions expérimentales, l'apparition de produits de dégradation de la fibrine a lieu quelques heures après cette dépolymérisation et permettrait de mettre en évidence le FSF dans le mélange lysé, qu'il faut distinguer d'un produit précoce de dégradation /De BOISSEZON (28)/. De plus, l'adjonction d'une goutte de sérum provoque la repolymérisation de la fibrine vraisemblablement par réincorporation du FSF à la fibrine dépolymérisée.

# C H A P I T R E III

## ETUDE CINETIQUE

# METHODES D'ETUDE DE LA FIBRINOLYSE

La plupart des difficultés d'interprétation des différentes études du système fibrinolytique proviennent des méthodes utilisées, en particulier pour le dosage des inhibiteurs. Si la caséine est utilisée comme substrat, le test mesurera les inhibiteurs de l'hydrolyse de la caséine, dont le résultat ne sera pas nécessairement semblable à celui d'un test véritablement fibrinolytique, utilisant la fibrine comme substrat. En outre, en ce qui concerne l'emploi de substrats synthétiques, il a été noté que des antiplasmines réduisant l'activité d'un système fibrinolytique sur un test à la caséine ne provoquaient aucune modification de l'activité estérasique /Von KAULLA (70)/. Ceci permet de recommander l'emploi de la fibrine comme substrat et, si cette approche rend le problème plus complexe, la fibrine pouvant entrer en compétition avec l'antiplasmine et dissocier le complexe plasmine-antiplasmine, c'est un test véritablement fibrinolytique au travers duquel on peut espérer obtenir une meilleure connaissance de la fibrinolyse en tant que phénomène physiologique.

L'impureté des réactifs utilisés reste, naturellement, une des sources de discussion des résultats obtenus, puisque les préparations de plasmine risquent d'être contaminées par des activateurs. Le sérum dont nous voulons estimer le contenu en inhibiteurs renferme peut-être un grand nombre de substances risquant de jouer un rôle au cours du test et le fibrinogène sera toujours souillé par du plasminogène, ayant subi, à un degré variable, un processus d'activation autocatalytique. C'est ce dernier point qui permettrait de trouver une justification aux techniques utilisant la caséine ou les esters synthétiques, dont les résultats sont, malgré tout, sujets à des doutes moindres en ce qui concerne l'influence des impuretés, mais plus profonds quant à la nature de ce qui est réellement mesuré.

Cette revue rapide des points délicats de l'étude expérimentale de la fibrinolyse montre qu'il est nécessaire de pratiquer les tests suivant un protocole précis et explique la variété des techniques utilisées par divers auteurs, ce qui rend souvent difficile la comparaison de leurs résultats. Le choix d'une technique dépend essentiellement du but poursuivi : nous cherchons à décrire les phénomènes qui interviennent au cours de la lyse du caillot de fibrine et c'est pourquoi nous prenons pour paramètre le temps de lyse d'un caillot standard selon la technique de HAWKEY et STAFFORD (63). Dans un tube à hémolyse, de calibre donné, on forme le caillot standard en mettant successivement :

- 0,6 ml d'une solution contenant 0,1 ml d'une dilution de sérum au 1/10 dans le tampon de HAWKEY

- 0,1 ml d'euglobulines

- 0,2 ml de fibrinogène à 1 % (dans le tampon de HAWKEY)

- 0,1 ml d'activateur (streptokinase, urokinase) ou de plasmine

- 0,1 ml de thrombine.

Le mélange est porté au bain-marie à 37°C, et, après une coagulation quasi immédiate, on mesure le temps de lyse de ce caillot standard au moment où le contenu du tube à hémolyse est devenu limpide et suffisamment fluide pour couler le long des parois quand on incline le tube. Nous considérons alors que ceci correspond à une réduction déterminée de la viscosité du mélange, reliée à la dissolution d'une proportion donnée de fibrine. Dans notre étude cinétique, nous dirons qu'à cet instant T, la concentration de fibrine polymérisée dans le tube est $F(T) = \alpha F_o$, si $F_o$ désigne la concentration initiale. L'introduction du coefficient $\alpha$ ($o \leqslant \alpha < 1$) est une simple précaution que justifie le mode opératoire, compte tenu du fait

qu'il est peu probable que le polymère de fibrine ait été totalement lysé au moment où le mélange d'incubation redevient limpide et fluide. Il n'est pas possible de déterminer une valeur de $\alpha$ mais on peut supposer $\alpha$ petit et relativement constant pour un expérimentateur exercé.

## CINETIQUE DE LA LYSE DU CAILLOT STANDARD

La recherche de la cinétique de la fibrinolyse est une approche récente de l'étude des réactions qui entrent en jeu, et qui doit permettre une meilleure compréhension des phénomènes qui la régissent.

Certains auteurs décrivent cette cinétique d'après l'observation expérimentale de l'évolution, en fonction du temps, d'un système fibrinolytique en présence d'un substrat : par ce procédé, IONESCO-STOIAN et coll. (1969) étudient l'action estérasique (sur le LEe) et caséinolytique du système streptokinase-plasminogène humain.

Cet abord du problème de la cinétique correspond à une méthode usuelle de la détermination des activités enzymatiques, mais suppose réalisable la mesure de la dégradation du substrat, ce qui nécessite l'emploi de substrats synthétiques ou de caséine ; de ce fait, il n'est pas certain que les résultats correspondant à ces études soient en rapport avec les phénomènes de fibrinolyse. D'autres travaux (BERG et coll., GALLIMORE et SHAW, MERRILLS et SHAW, LINIGER et RUEGSEGGER) se fixent un modèle mathématique décrivant les réactions entre les divers constituants du système sous forme d'équations différentielles, et leur résolution permet de déterminer une relation entre les divers paramètres, relation qui est ensuite recherchée par l'expérience. Cette forme d'étude de la cinétique est toutefois une source d'écueils, car

l'adéquation des résultats expérimentaux aux conclusions suggérées par le modèle ne prouve, en aucun cas, que l'ensemble des hypothèses de départ était exact, ce qui incite à la plus grande prudence dans les conclusions de telles études. De plus, ces équations de cinétique sont des équations différentielles et, s'il est facile de les poser a priori, en faisant intervenir les diverses substances qui entrent en jeu, il n'est pas toujours possible d'obtenir une solution exprimable mathématiquement, et seuls des modèles simples seront utilisables.

Les travaux de BERG (21-22) portent sur la lyse d'un caillot de fibrine par la plasmine formée à partir de plasminogène activé par l'urokinase. Pour BERG, la lyse visible de la fibrine est décrite par l'équation :

$$\frac{dF}{dt} = - k_1 P \qquad (1)$$

dans laquelle F représente la concentration en fibrine du système-test, $\frac{dF}{dt}$ sa dérivée et P la concentration de plasmine : cette équation (d'ordre 0 par rapport à la fibrine) indique que la disparition de la fibrine est d'autant plus rapide que la plasmine est plus concentrée, mais indépendante de la concentration en fibrine.

GALLIMORE et SHAW (52 bis) ont montré l'importance des ions ($Na^+$, $Cl^-$) dans la cinétique du phénomène lytique et ont mis en évidence le rôle des inhibiteurs sériques par le retard de la lyse d'un caillot de fibrine en présence de quantités variables de sérum.

BERG (21), GALLIMORE et SHAW (52 bis), MERRILLS et SHAW (96) avaient décrit la lyse de la fibrine par l'équation (1), mais LINIGER et RUEGSEGGER (84) ont envisagé un modèle plus complexe, dans lequel toutes les réactions sont du premier ordre, et qui

fait intervenir les antiplasmines progressives en négligeant les antiplasmines immédiates. Dans ce modèle, l'équation de lyse s'écrit :

$$\frac{dF}{dt} = - KP.F$$

et, les autres équations ayant la même forme, il est impossible d'obtenir une formulation mathématique de la solution, ce qui conduit à un traitement par ordinateur.

Nous avons cherché à élaborer un modèle plus simple, partant de l'équation de BERG

$$\frac{dF}{dt} = - k_1 P$$

qui corresponde à nos résultats expérimentaux, et qui fasse intervenir les antiplasmines immédiates et progressives, mais sans décrire la formation de la plasmine à partir du plasminogène, de sorte que la partie expérimentale sera constituée par la mesure de temps de lyse de caillots standards par la plasmine en présence de sérum.

En fait, l'équation (1) ne saurait rendre compte de la cinétique de la lyse d'un caillot de fibrine par la plasmine en présence d'une quantité constante d'inhibiteurs. L'intégration de cette équation en $F(t) = F_o - k_1 P_o t$ fournirait, pour le temps de lyse T /tel que $F(T) = \alpha F_o$/, l'équation suivante :

$$\frac{1}{T} = \frac{k_1 P_o}{F_o (1-\alpha)}$$

Ceci signifie que l'inverse du temps de lyse, si l'on active le caillot par de la plasmine, est proportionnel à la quantité de plasmine, ce qui doit se traduire, sur un graphique, par une droite passant par l'origine des coordonnées. L'expérience

montre qu'il n'en est rien /DAVER et coll. (43)/, car la droite obtenue ne peut passer par l'origine des coordonnées (effet qu'une première approximation attribue aux antiplasmines immédiates) ; de plus, la linéarité n'est satisfaisante que dans un domaine restreint, c'est-à-dire uniquement si les concentrations de plasmine ne sont pas trop importantes. Cette distorsion peut s'expliquer de deux façons simples :

- par l'intervention des antiplasmines progressives,

- par l'interférence de la coagulation si le temps de lyse devient trop faible, ce qui est le cas avec de fortes concentrations de plasmine.

Néanmoins, l'équation $\frac{dF}{dt} = k_1 P$ ne peut, à elle seule, rendre compte des faits expérimentaux et c'est pourquoi nous cherchons à élaborer un modèle mathématique qui fasse intervenir l'effet des antiplasmines sériques.

# MODELE MATHEMATIQUE

## FORMULATION DU MODELE

### Hypothèses

Nous supposons que les antiplasmines immédiates ont pour effet global de bloquer une quantité I de plasmine et que cette plasmine, après inhibition immédiate, n'est pas disponible pour effectuer la lyse du caillot de fibrine. Ceci peut correspondre à la formation rapide d'un complexe plasmine-antiplasmine immédiate, et nous considérons, en outre, que ce complexe ne se dissocie pas au cours de la mesure du temps de lyse. Cette hypothèse simplificatrice n'est pas sans fondement, puisque l'on considère que la formation de ce complexe est le résultat d'une action compétitive entre l'antiplasmine et la fibrine pour la plasmine (SHERRY) : de ce fait, la dissociation ne pourrait provenir que d'un accroissement de concentration de la fibrine, ce qui n'est pas le cas dans notre test.

Ainsi, nous considérons que la plasmine "disponible" se trouve dans le tube en quantité

$P^* = P - I$ (si $P > I$, $P^* = 0$ dans le cas contraire).

Nous postulons, pour l'action de l'antiplasmine progressive, une inactivation de la plasmine disponible $P^*$ semblable à la dénaturation de la thrombine par l'antithrombine progressive /ĀBILDGAARD (6)/, c'est-à-dire suivant une réaction dont la vitesse serait :

$$\frac{dP^*}{dt} = - k_2 \times P^*$$

en notant X la concentration en antiplasmine progressive. En fait, nous n'excluons pas non plus l'existence de plusieurs substances analogues, mais nous

tenons compte d'un effet global : en supposant qu'il existe n antiplasmines progressives réagissant avec cette cinétique, nous écririons :

$$\frac{dP^*}{dt} = - \sum_{i=1}^{n} k_{2i} X_i P^* = - \left(\sum_{i-1}^{n} k_{2i} X_i\right) P^* = - k_2 X P^*$$

Nous conservons l'équation de lyse (1), mais en ne faisant intervenir que la plasmine effectivement disponible. Ainsi, l'évolution, au cours du temps, du contenu en fibrine et en plasmine du tube à hémolyse est décrite par le système d'équations :

$$(I) \quad \begin{cases} P^* = P - I & (a) \\ \dfrac{dP^*}{dt} = - k_2 X P^* & (b) \\ \dfrac{dF}{dt} = - k_1 P^* & (c) \end{cases}$$

Résolution

Pour déterminer la variation de la concentration de fibrine en fonction du temps, il nous faut connaître, à tout instant t, la concentration en plasmine, donc résoudre l'équation qui décrit la dégradation de la plasmine, puis reporter ce résultat dans l'équation de lyse.

- Dégradation de la plasmine disponible :

$$\frac{dP^*}{dt} = - k_2 X P^*$$

En supposant que X reste en quantité constante, c'est-à-dire en admettant une destruction

catalytique de la plasmine par l'antiplasmine progressive, nous pouvons intégrer cette équation différentielle du 1er ordre, qui est immédiatement séparable :

$$\frac{dP^*}{P^*} = - k_2 X \, dt$$

$$\text{Log} \frac{P^*}{P^*_o} = - k_2 X t$$

$$P^* = P^*_o \, e^{- k_2 X t}$$

Cette forme indique qu'au bout d'un temps suffisamment long, la plasmine sera totalement inactivée.

- Lyse de la fibrine

En reportant le résultat précédent dans l'équation de lyse, nous écrirons :

$$\frac{dF}{dt} = - k_1 P^* = - k_1 P^*_o \, e^{- k_2 X t}$$

Cette équation, à variables séparées, s'intègre aisément en :

$$F(t) = + \frac{k_1}{k_2 X} P^*_o \, e^{- k_2 X t} + \text{constante}$$

La constante est déterminée par la condition initiale $F(t = 0) = F_o$

$$F(o) = F_o = \frac{k_1 P^*_o}{k_2 X} + \text{constante}$$

soit $$F(t) = F_o + \frac{k_1 P_o^*}{k_2 X} (e^{- k_2 X t} - 1)$$

et le temps de lyse T est défini par :

$$F(T) = \alpha F_o = F_o + \frac{k_1 P_o^*}{k_2 X} (e^{- k_2 X T} - 1)$$

soit $$e^{- k_2 X T} - 1 = - \frac{F_o (1-\alpha)}{k_1 P_o^*} k_2 X$$

ou $$T = - \frac{1}{k_2 X} \text{Log} \left[ 1 - \frac{F_o (1-\alpha)}{k_1 P_o^*} k_2 X \right]$$

nous notons que l'expression qui fournit le temps de lyse n'est linéaire par rapport à aucun des différents paramètres qui entrent en jeu, et, de ce fait, il sera nécessaire d'avoir recours à certaines approximations si l'on cherche à appliquer cette formule de façon commode à nos résultats expérimentaux.

## APPLICATION AUX DONNEES EXPERIMENTALES

La formule du temps de lyse

$$T = - \frac{1}{k_2 X} \text{Log} \left[ 1 - \frac{F_o (1-\alpha)}{k_1 P_o^*} k_2 X \right]$$

se prête facilement à un développement en série, qui est justifié quand

$$\frac{F_o\ (1-\alpha)}{k_1\ P^*_o}\ k_2\ X < 1$$

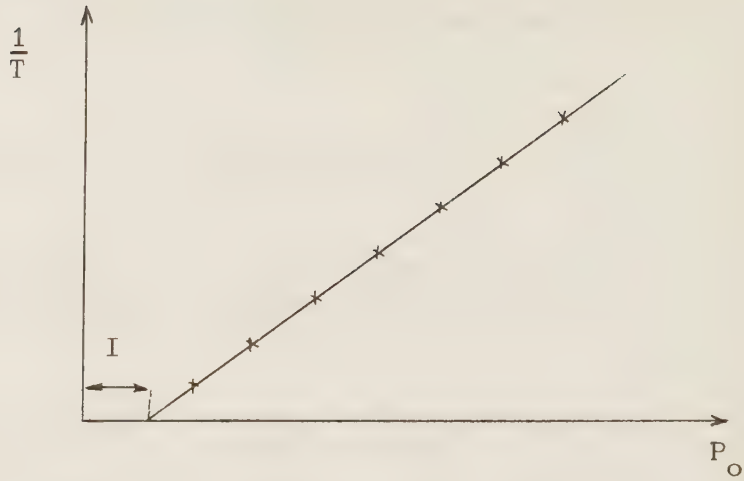
donc, en particulier, si les inhibiteurs progressifs sont en faible quantité. Nous obtenons alors :

$$T \simeq \frac{F_o\ (1-\alpha)}{k_1\ P^*_o} - \frac{1}{2}\left[\frac{F_o\ (1-\alpha)}{k_1\ P^*_o}\right]^2 k_2\ X + \ldots$$

ce qui, limité au premier terme, fournit une forme simplifiée :

$$\frac{1}{T} = \frac{k_1\ P^*_o}{F_o\ (1-\alpha)} = \frac{k_1}{F_o\ (1-\alpha)}\ (P_o - I)$$

Cette approximation, bien qu'on ne puisse la légitimer a priori, correspond à la résolution directe de l'équation I (c) en négligeant l'effet des antiplasmines progressives. Ceci, sur un graphique $\frac{1}{T}$ fonction de $P_o$, fournit des lignes droites qui passent à droite de l'origine des coordonnées, quand on fait varier la quantité initiale de plasmine en conservant une quantité constante d'inhibiteurs sériques. A partir d'un tel graphique, on peut d'ailleurs estimer le taux d'antiplasmines immédiates par l'abscisse de l'intersection de la droite obtenue et de l'axe des valeurs de plasmine.




Cette façon de procéder est néanmoins grossière, car si l'on effectue la détermination de I avec diverses dilutions du sérum à tester, les résultats obtenus ne sont pas proportionnels aux dilutions. De fait, l'approximation qui revient à négliger l'activité antiplasmine progressive apparaît illégitime et il est nécessaire, avec la solution obtenue, de pousser le développement jusqu'au second ordre.

Pour cette seconde approximation, si nous reprenons l'expression du temps de lyse en fonction des divers paramètres, nous obtenons, au second ordre :

$$T \simeq \frac{F_o\,(1-\alpha)}{k_1\,P_o^*} - \frac{1}{2}\left[\frac{F_o\,(1-\alpha)}{k_1\,P_o^*}\right] k_2\,X$$

Cette formulation ne se prête pas aux calculs statistiques puisque les divers paramètres interviennent de façon non linéaire, et, de plus, si l'expérience nous indique que le développement au premier ordre est illégitime, il en est peut-être de même au second ordre. Pour rechercher une expression plus commode, nous effectuons nos calculs sur la fonction

qui décrit l'évolution de la fibrine en fonction du temps :

$$F(T) = \alpha F_o = F_o + \frac{k_1 P_o^*}{k_2 X} \left(e^{-k_2 X T} - 1\right)$$

Ceci peut être développé suivant les puissances de $k_2 X T$, et, à la différence du logarithme, le développement en série de l'exponentielle converge toujours. Nous obtenons :

$$F(t) = F_o - k_1 P_o^* t + (k_1 P_o^*) k_2 X \frac{t^2}{2} - \frac{(k_1 P_o^*)(k_2 X)^2 t^3}{6} + \ldots$$

et nous limitons ce développement au terme en $t^2$, puisque la limitation au terme t donnerait le résultat précédent. Nous écrivons toujours qu'à l'instant T où la lyse du caillot est observée, la fibrine se trouve à une concentration :

$$F(T) = \alpha F_o$$

et nous obtenons :

$$F_o (1-\alpha) = k_1 P_o^* T - (k_1 P_o^*)(k_2 X) \frac{T^2}{2}$$

Exprimons ceci en fonction de l'ensemble des paramètres expérimentaux et inconnus, c'est-à-dire en fonction de $P_o$, de I et des dilutions de sérum ; rappelons que, par hypothèse :

$$P^* = P - I \quad \text{soit} \quad P_o^* = P_o - I$$

Notons $S_o$ la concentration du sérum dans le mélange d'incubation et s la dilution considérée de ce sérum pour un test donné.

Alors, si $I_o$ et $X_o$ désignent la concentration des antiplasmines sériques :

$$I = I_o \; S_o \; s$$

$$X = X_o \; S_o \; s$$

et nous obtenons :

$$F_o\,(1-\alpha) = k_1\,P_o\,T - k_1\,I_o\,S_o\,sT - (k_1\,P_o)\,k_2\,X_o\,S_o\,s\,\frac{T^2}{2}$$

$$+ k_1\,(I_o\,S_o\,s)(k_2\,X_o\,s\,S_o)\frac{T^2}{2}$$

soit :

$$P_oT = S_o\,I_o\,(sT) + S_o\,\frac{k_2}{2}\,X_o\,(P_o\,sT^2)$$

$$-\frac{k_2}{2}\,S_o^2\,I_o\,X_o\,(s^2T^2) + \frac{F_o\,(1-\alpha)}{k_1}$$

Ainsi, en réalisant diverses mesures de temps de lyse d'un caillot standard en présence de quantités connues de plasmine et de dilutions connues de sérum, cette expression prend la forme :

$$\left[P_o\,T\right] = a_1\left[s\,T\right] + a_2\left[P_o\,s\,T^2\right]$$

$$- a_3\left[s^2\,T^2\right] + a_4$$

et, dans cette égalité, tous les termes entre crochets sont connus et il reste à déterminer les constantes :

$$a_1,\ a_2,\ -a_3,\ a_4$$

que l'on calcule comme les coefficients de la régression multiple entre $P_o T$ et les trois autres variables :

$$sT,\ P_o\ s\ T^2,\ s^2\ T^2$$

Cette formulation n'est pas très simple, d'autant qu'elle ne se prête pas à une représentation graphique, puisque l'équation :

$$\left[P_o\ T\right] = a_1 \left[sT\right] + a_2 \left[P_o\ sT^2\right] + a_3 \left[s^2\ T^2\right] + a_4$$

est celle d'un hyperplan dans un espace à 4 dimensions qui nécessite donc plus de quatre mesures de temps de lyse pour sa détermination. D'après ce modèle, on peut obtenir une représentation linéaire entre deux des variables entre crochets, à condition de conserver les deux autres ou leur combinaison linéaire fixes, ce qu'aucun plan d'expérimentation ne permet de réaliser à coup sûr.

La recherche d'une régression multiple pose des problèmes délicats quant à la significativité des variables retenues, compte tenu de leur éventuelle dépendance, et nous n'insisterons pas sur cet aspect. Néanmoins, indépendamment de la qualité de la corrélation, l'étude expérimentale permettra de tester notre modèle, car, dans le cas d'un sérum donné, les résultats doivent être tels que $a_1\ a_2 \simeq a_3$ pour que la théorie soit acceptable.

La détermination expérimentale des inhibiteurs sériques, selon ce modèle, est assez lourde, puisqu'elle nécessite l'obtention d'un nombre de

points relativement important (au moins quatre de toute façon), ce qui est particulièrement long, puis la mise en oeuvre d'un calcul complexe, comme nous le verrons, mais qui peut être fait au moyen d'un calculateur de bureau. En échange les résultats du calcul fournissent :

- une estimation de l'activité antiplasmine immédiate du sérum, exprimable en unités de plasmine,

- une estimation de l'activité antiplasmine progressive du sérum, exprimée par le terme $k_2 X$, qui est la variable cinétique significative et représente bien cet effet progressif, puisque ce résultat permet d'obtenir la proportion de plasmine inactivée par unité de temps,

- un "test de vraisemblance" qui est satisfaisant si le produit des deux premiers coefficients est voisin du troisième (au signe près),

- une estimation de la constante de vitesse $k_1$, par l'intermédiaire du quatrième coefficient :

$$a_4 = \frac{F_o\ (1-\alpha)}{k_1} .$$

Cette estimation n'est que relative puisque, si $F_o$ est constant dans nos conditions, et même déterminable, nous ne savons rien de la valeur de $\alpha$. Par contre, nous pourrons étudier les variations de $k_1$ puisque ceci revient, à $F_o$ et $\alpha$ constants, à définir une unité arbitraire pour $k_1$.

## DETERMINATION DES INHIBITEURS SERIQUES

### Rappel de la méthode d'analyse des résultats

Rappelons tout d'abord les bases du calcul statistique permettant de déterminer les coefficients

d'une régression multifactorielle. Nous supposons que y est fonction de trois variables $x_1$, $x_2$, $x_3$ sous la forme :

$$y = A_1 x_1 + A_2 x_2 + A_3 x_3 + A_4 .$$

On recherche les paramètres $A_1$, $A_2$, $A_3$, $A_4$ par une généralisation de la méthode des moindres carrés : les estimations $a_1$, $a_2$, $a_3$ de $A_1$, $A_2$, $A_3$ sont les solutions du système d'équations linéaires :

$$a_1 S_{x_1^2} + a_2 S_{x_2 x_1} + a_3 S_{x_3 x_1} = S_{y x_1}$$

$$a_1 S_{x_1 x_2} + a_2 S_{x_2^2} + a_3 S_{x_3 x_2} = S_{y x_2}$$

$$a_1 S_{x_1 x_3} + a_2 S_{x_2 x_3} + a_3 S_{x_3^2} = S_{y x_3}$$

avec les notations :

$$S_{x_i y} = \Sigma x_i y - \frac{1}{n} (\Sigma x_i) (\Sigma y)$$

$$S_{x_i^2} = \Sigma x_i^2 - \frac{1}{n} (\Sigma x_i)^2$$

$$S_{x_i x_j} = \Sigma x_i x_j - \frac{1}{n} (\Sigma x_i) (\Sigma x_j)$$

les sommes étant étendues à tous les n points expérimentaux.

L'estimation $a_4$ de $A_4$ s'obtient en écrivant que l'équation de régression est vérifiée pour les coordonnées du point moyen, ce qui revient à dire que le point moyen appartient à l'hyperplan de régression soit :

$$\frac{1}{n}\sum y = a_1 \frac{1}{n}\sum x_1 + a_2 \frac{1}{n}\sum x_2 + a_3 \frac{1}{n}\sum x_3 + a_4$$

ou $$a_4 = \frac{1}{n}\left[\sum y - a_1 \sum x_1 - a_2 \sum x_2 - a_3 \sum x_3\right]$$

C'est ce que nous utiliserons dans la détermination des antiplasmines immédiates et progressives dans le sérum, en prenant pour variables :

$$y = P_o T$$

$$x_1 = sT$$

$$x_2 = P_o\, sT^2$$

$$x_3 = s^2\, T^2$$

Données expérimentales relatives à quelques sérums

Nous procédons à la mesure du temps de lyse du caillot standard obtenu en présence de sérum entier et dilué au demi, en activant ce caillot par un volume fixe d'une solution de plasmine préparée à raison de trois gouttes de plasmine Kabi glycérolée, titrant 25 unités Sgouris par flacon de 2 ml, pour une goutte de sérum physiologique, cette solution étant prise aux dilutions 1/1, 3/4, 1/2, 1/4. De ce fait, nous disposons d'un tableau de seize valeurs pour chaque sérum testé, les déterminations étant effectuées en double.

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 10'15"<br>9'45" | 25'<br>26'15" | 28'<br>29'25" | 34'25"<br>34' |
| 1/2 | 2'15"<br>2'45" | 3'45"<br>3'35" | 6'15"<br>5'45" | 17'15"<br>16'25" |

Sérum nº 1

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 8'15"<br>8'25" | 11'25"<br>11'15" | 18'15"<br>18' | 29'<br>29'15" |
| 1/2 | 1'45"<br>1'35" | 3'35"<br>3'45" | 8'25"<br>8'15" | 17'25"<br>17'15" |

Sérum nº 2

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 7'25"<br>8' | 13'25"<br>13'15" | 19'15"<br>19' | 30'<br>30'15" |
| 1/2 | 1'45"<br>2' | 2'25"<br>2'15" | 9'45"<br>9'15" | 16'25"<br>16' |

Sérum nº 3

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 8'<br>8'15" | 10'45"<br>11' | 18'<br>17'45" | 28'45"<br>27'35" |
| 1/2 | 2'<br>1'45" | 3'25"<br>3'35" | 8'15"<br>8' | 16'25"<br>16'15" |

Sérum nº 4

| Plasmine / Serum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/4 | 7'35"<br>7'15" | 16'25"<br>16'15" | 21'<br>20'15" | 33'15"<br>32'25" |
| 1/2 | 2'15"<br>2' | 5'35"<br>5'25" | 10'15"<br>10'15" | 19'15"<br>19' |

Sérum n° 5

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 10'<br>9'45" | 24'<br>25' | 27'15"<br>26'35" | 35'<br>34'25" |
| 1/2 | 1'25"<br>1'35" | 2'25"<br>3'15" | 6'<br>5'35" | 19'25"<br>18'25" |

Sérum n° 6

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 7'15"<br>7' | 16'<br>15'45" | 21'15"<br>21'25" | 32'15"<br>32' |
| 1/2 | 2'25"<br>2'15" | 6'<br>5'45" | 10'25"<br>10' | 18'25"<br>18'15" |

Sérum n° 7

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 9'15"<br>9'35" | 12'25"<br>12' | 19'25"<br>18'45" | 30'<br>29'25" |
| 1/2 | 2'<br>1'45" | 4'15"<br>4' | 9'15"<br>9' | 16'45"<br>16'35" |

Sérum n° 8

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 10'15"<br>9'45" | 25'<br>26'15" | 28'<br>29'25" | 34'25"<br>34' |
| 1/2 | 2'15"<br>2'45" | 3'45"<br>3'35" | 6'15"<br>5'45" | 17'15"<br>16'25" |

Sérum n° 1

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 15'25"<br>15' | 31'<br>30'25" | 34'<br>33'25" | 39'25"<br>40'15" |
| 1/2 | 6'<br>6'35" | 9'25"<br>9' | 14'15"<br>13'25" | 23'15"<br>22'25" |

Sérum n° 1a

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 20'25"<br>19'45" | 34'<br>33'25" | 39'<br>37' | 46'<br>45'25" |
| 1/2 | 12'<br>10'45" | 13'25"<br>13'15" | 17'25"<br>16'25" | 28'25"<br>28' |

Sérum n° 1b

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 30'<br>29'25" | 44'<br>43' | >60'<br>- | >60'<br>- |
| 1/2 | 22'<br>22' | 24'25"<br>24'15" | 35'25"<br>35' | 45'<br>44' |

Sérum n° 1c

Les sérums 1a, 1b, 1c étaient identiques au sérum n° 1 mais le temps de lyse a été mesuré en présence d'inhibiteur de FREY.

1a = 20 gouttes = 1 ml
1b = 25 gouttes = 1,25 ml
1c = 30 gouttes = 1,5 ml
} dans 1 ml de sérum, et dilution au 1/10 dans le tampon de HAWKEY

Résultats

Nous prenons, pour valeur de $P_o$, les dilutions de plasmine (1, 3/4, 1/2, 1/4), pour s les dilutions de sérum (1, 1/2) et nous effectuons les calculs de $a_1$, $a_2$, $a_3$, $a_4$ en prenant 10 minutes comme unité de temps. Les résultats ainsi obtenus sont rapportés dans le tableau II.

Tableau II

Résultats de l'étude statistique des sérums testés

| Sérum n° | $a_1$ | $a_2$ | $a_1 a_2$ | $a_3$ | $a_4$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,50255 | 0,320706 | 0,16117 | 0,171474 | 0,163883 |
| 2 | 0,269692 | 0,539348 | 0,14546 | 0,170586 | 0,204098 |
| 3 | 0,367910 | 0,450421 | 0,16571 | 0,174406 | 0,174748 |
| 4 | 0,258300 | 0,550932 | 0,14230 | 0,170474 | 0,205526 |
| 5 | 0,176177 | 0,470884 | 0,08296 | 0,124339 | 0,287856 |
| 6 | 0,513820 | 0,322547 | 0,16573 | 0,171195 | 0,132884 |
| 7 | 0,176578 | 0,459815 | 0,08119 | 0,123611 | 0,297790 |
| 8 | 0,211734 | 0,565336 | 0,11970 | 0,158721 | 0,229193 |
| 1a | 0,178395 | 0,306077 | 0,0546 | 0,093965 | 0,502552 |
| 1b | -0,223474 | 0,315974 | -0,07061 | 0,025215 | 0,953834 |
| 1c | -0,488004 | 0,433721 | -0,21165 | 0,132529 | 1,743892 |

Dans cette expérimentation, deux sérums avaient été testés en double insu et l'on constate, sur ce tableau, une similitude frappante des résultats obtenus pour les sérums 2 et 4 ainsi que 5 et 7 qui étaient effectivement identiques. Cette similitude se retrouve dans les paramètres des sérums 1 et 6, sauf pour $a_4$, ce qui permet de les distinguer, puisque ce faible écart, si faible soit-il, est inférieur à celui observé sur les sérums testés en double ; en effet, sur ces sérums, cette valeur de $a_4$ est très reproductible, ce qui met en évidence la stabilité du coefficient $\alpha$ que nous avons introduit

$$\left[ a_4 = \frac{F_o\,(1-\alpha)}{k_1} \right].$$

Remarquons que si la méthode fournit des résultats très reproductibles en ce qui concerne les sérums testés en double, la comparaison du produit $a_1\ a_2$ et du coefficient $a_3$ est moins satisfaisante car, systématiquement, $a_1\ a_2 < a_3$ ; ceci est très net quand le temps de lyse est mesuré en présence d'inhibiteur de FREY. Ceci laisse supposer que l'adjonction de cet inhibiteur modifie la cinétique et peut-être que le modèle que nous avons établi ne s'applique plus.

Nous rapportons, dans le tableau III, l'activité antiplasmine des sérums testés exprimée comme suit :

- antiplasmines immédiates : équivalent plasmine (unité Sgouris/ml de sérum),

- antiplasmines progressives :

  . pourcentage de plasmine non inhibée en 10 minutes par 0,1 ml de sérum, dans les conditions du caillot standard (dilué au 1/10),

  . temps nécessaire pour produire une inactivation de 50 %,

- constante de vitesse $k_1$ (en supposant $\alpha = 0$ pour ce calcul).

Tableau III

Paramètres fibrinolytiques des sérums testés

| Sérum n° | Antiplasmines immédiates (U.S./ml)* | Plasmine restant après 10 mn | Temps d'inactivation de 50 % de plasmine | $k_1$ (mg/mn x U.S.)* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9,42 | 52 % | 10'50" | 0,640 |
| 2 | 5,06 | 34 % | 6'25" | 0,516 |
| 3 | 6,90 | 40,5 % | 7'45" | 0,610 |
| 4 | 4,84 | 34 % | 6'20" | 0,519 |
| 5 | 3,03 | 38 % | 7'20" | 0,370 |
| 6 | 9,63 | 52,5 % | 10'45" | 0,803 |
| 7 | 3,31 | 40 % | 7'30" | 0,358 |
| 8 | 3,97 | 32 % | 6'05" | 0,459 |
| 1a | 3,34 | 54 % | 11'20" | 0,213 |
| 1b | -4,19 | 53 % | 11' | 0,112 |
| 1c | -9,15 | 42 % | 8' | 0,061 |

* U.S. = Unité Sgouris

Discussion

En présence de Zymofren, inhibiteur de la fibrinolyse, nous pouvions nous attendre à observer une augmentation des antiplasmines et cette expérimentation devait indiquer sur quel type d'antiplasmines allait porter cette augmentation. Dans la

mesure où notre modèle cinétique est encore valable, il nous faut constater que l'action antifibrinolytique du Zymofren est essentiellement due à une diminution importante de la constante de vitesse $k_1$. Ceci signifie que l'effet antifibrinolytique de l'inhibiteur de FREY se manifeste au niveau du caillot de fibrine, soit en renforçant sa structure et en inhibant stériquement la pénétration de la plasmine, soit par un mécanisme compétitif, en se fixant sur les sites où se manifeste l'action de la plasmine.

L'effet du Zymofren sur l'activité antiplasmine progressive est nul, sauf peut-être à forte dose, mais le phénomène a priori le plus troublant est l'effondrement de l'activité antiplasmine immédiate, qui devient même négative. Ceci pourrait être interprété en considérant que l'inhibiteur de FREY active le plasminogène en plasmine, ce plasminogène contaminant le fibrinogène utilisé pour la formation du caillot standard, mais cette explication n'est pas justifiée par l'expérience. Toutefois, le plasminogène adsorbé au fibrinogène pourrait s'y trouver, en partie, sous forme de plasmine. Dans ce cas, cette plasmine devrait être inactive, puisque le fibrinogène ne se dégrade pas, ce qui se comprend si la plasmine adsorbée au fibrinogène est liée à un inhibiteur. Alors, l'effet du Zymofren s'expliquerait par une dissociation du complexe plasmine-inhibiteur en sa présence ; un tel inhibiteur pourrait être l'$\alpha_2$- macroglobuline, qui est la seule antiplasmine réversible connue.

De toute façon, la diminution de l'activité antiplasmine immédiate en présence de Zymofren et l'apparition de valeurs non physiques (négatives) restent en relation avec les résultats des sérums témoins. Si l'on porte sur un graphique les valeurs trouvées pour $a_4$ en fonction de la valeur correspondante de $a_2$, les valeurs négatives de $a_2$ observées avec l'inhibiteur de FREY donnent lieu à des points situés sensiblement sur la même courbe que les points correspondant aux valeurs "physiques". Cette courbe a l'allure d'une hyperbole équilatère, dont l'axe des abscisses est une asymptote, ou d'une exponentielle (figure 12).

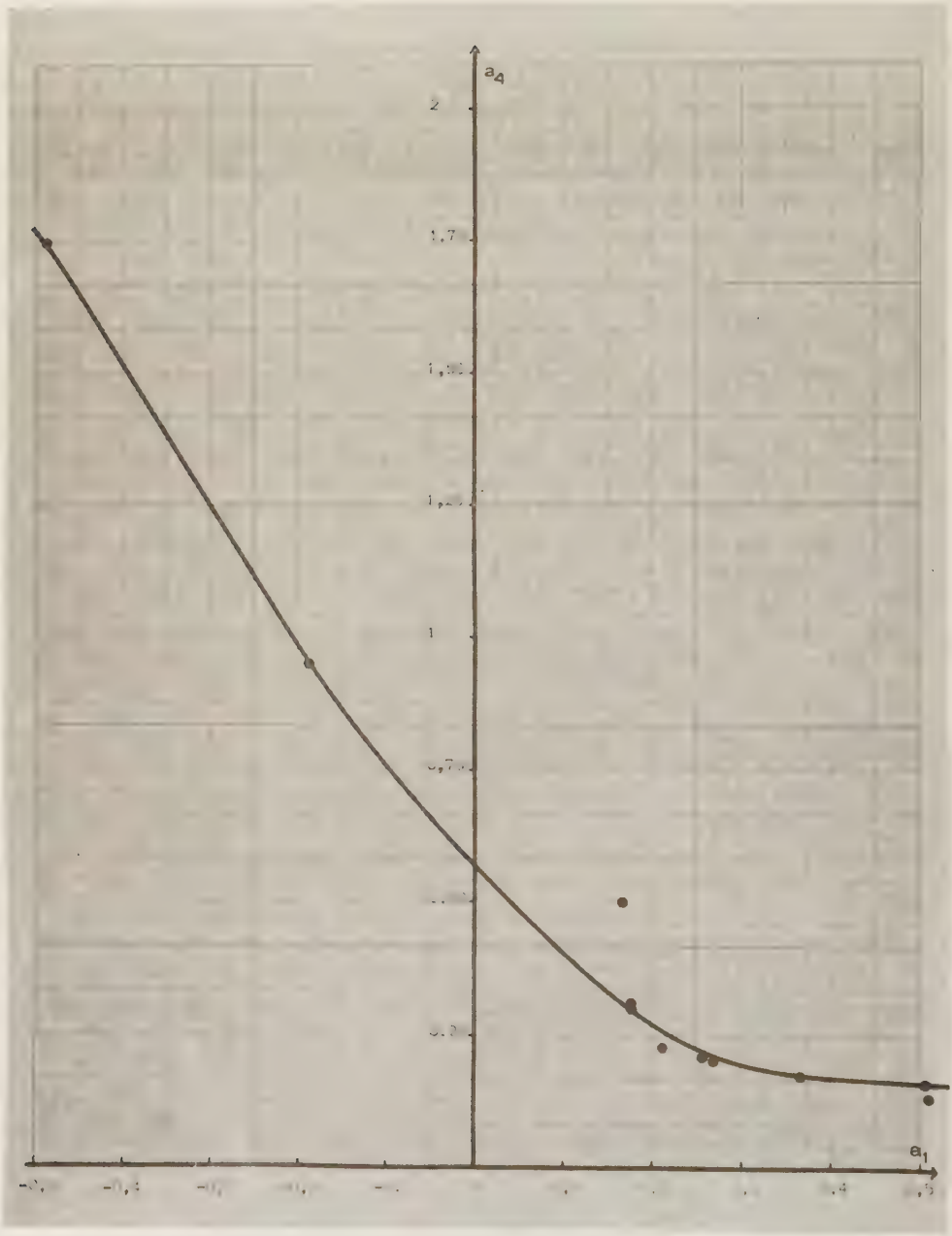



Figure 12

Ceci nous incite à rechercher une corrélation linéaire entre $k_1$ et le taux d'antiplasmines immédiates, ce que nous essayons d'établir en prenant comme variables :

$$\begin{cases} y = \dfrac{1}{a_4} \\ x = a_2 \end{cases}$$

et en recherchant une corrélation de la forme $y = ax + b$ (figure 13) sur les points déterminés avec les sérums seuls et en adjoignant les points déterminés en présence d'inhibiteur de FREY et donnant des valeurs "non physiques" d'antiplasmines immédiates.

La corrélation $y = 6{,}658\ x + 2{,}816$ est très satisfaisante puisqu'elle est caractérisée par un coefficient de corrélation $r = 0{,}911$, qui est hautement significatif ($P < 1°/_{oo}$) si l'on prend toutes les valeurs obtenues (en éliminant le sérum 1a qui semble avoir donné un point aberrant, le coefficient r passe à 0,958). Une régression semi-logarithmique (figure 14) fournirait des résultats satisfaisants ($r = 0{,}966$ avec tous les points) ; elle signifierait qu'avec une quantité quelconque d'inhibiteur de FREY, la lyse du caillot peut être obtenue si l'on attend suffisamment longtemps ; au contraire, la régression linéaire contient implicitement l'idée qu'en présence d'inhibiteur en concentration supérieure à une certaine limite, la lyse est impossible. Cette distinction ne peut être faite ici, puisque les coefficients de corrélation ne diffèrent pas significativement, et, de toute façon, un temps de lyse d'un caillot standard supérieur à deux heures est en général considéré comme infini.

Mais il est curieux de constater que la relation a cette forme : plus la mesure des antiplasmines immédiates est importante, plus le caillot a tendance à se lyser vite, alors que l'on s'attendrait plutôt

à une conclusion inverse. En fait, il est naturel de penser que la constante de vitesse de lyse $k_1$ dépend des conditions de milieu (pH, température, force ionique, en particulier $Ca^{++}$, inhibiteurs...) ; ce qui n'est pas exclu dans notre modèle, pourvu qu'elle soit indépendante des concentrations de plasmine et de fibrinogène.

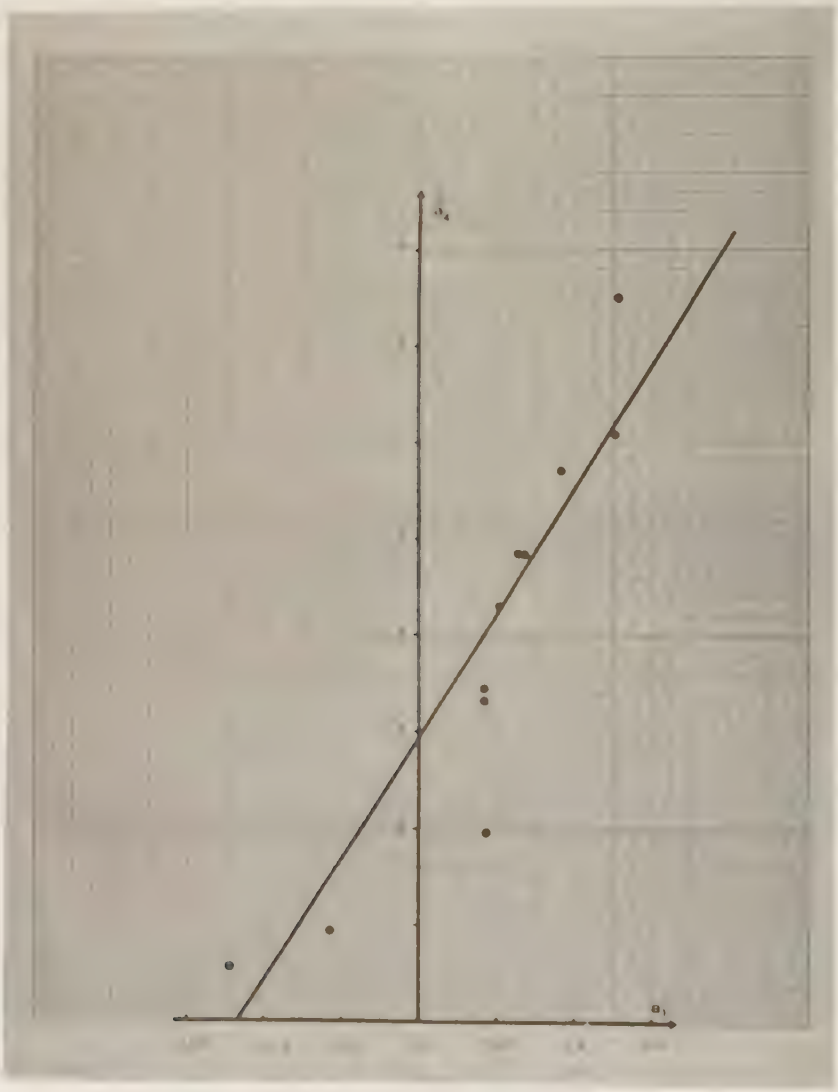


Figure 13

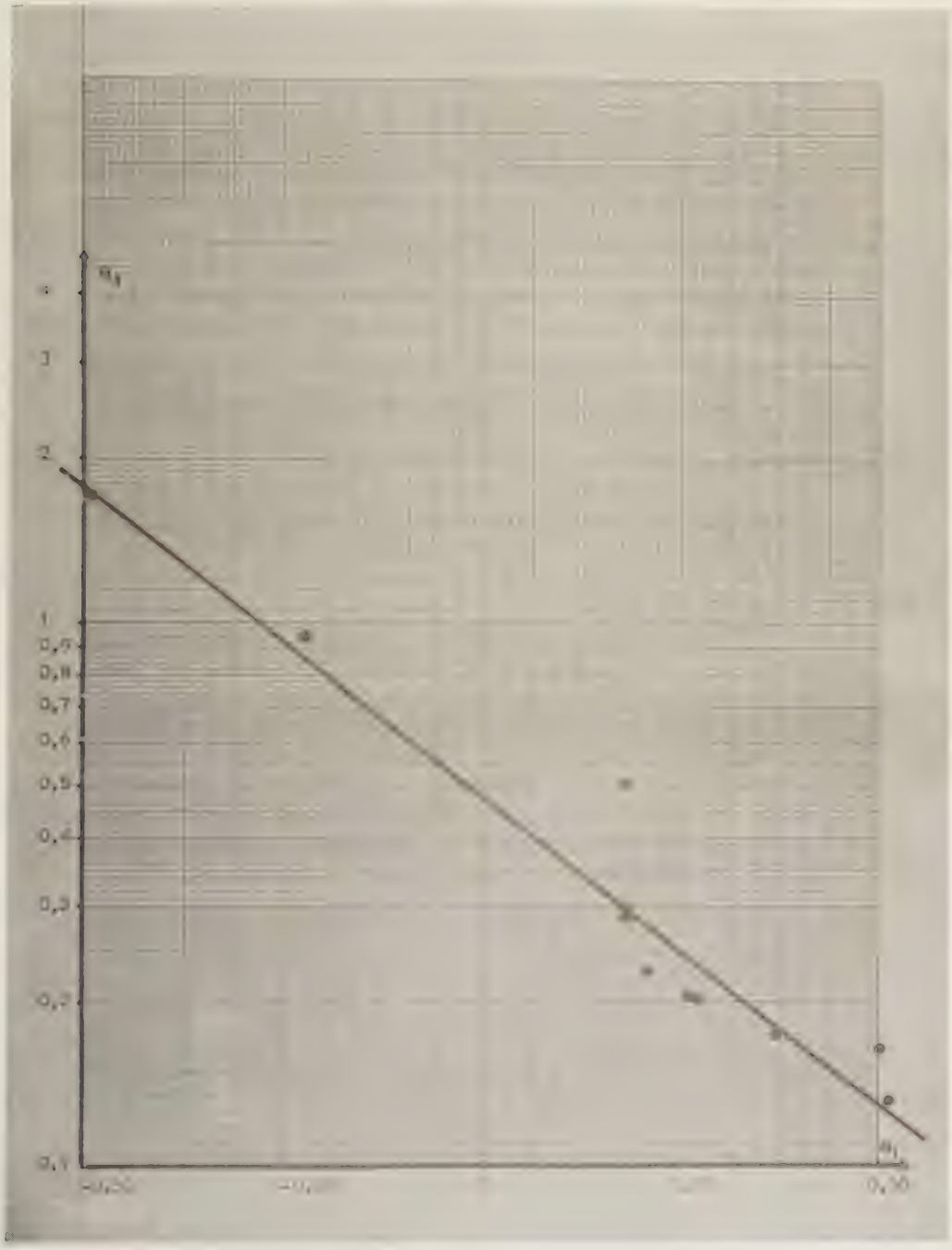



Figure 14

Ainsi, à partir d'un modèle mathématique simple qui décrit le comportement du système fibrinolytique dans les conditions du caillot standard, nous obtenons une méthode de détermination des antiplasmines sériques immédiates et progressives. Cette méthode de dosage est très reproductible, comme nous l'avons vu, même si elle se fonde sur la mesure du temps de lyse en présence de plasmine, mesure considérée comme beaucoup moins sûre que celle effectuée en utilisant un activateur comme l'urokinase. En fait, cette bonne reproductibilité tient au nombre important de déterminations effectuées qui permet une bonne compensation statistique des erreurs de mesure.

## Etude d'autres inhibiteurs thérapeutiques

Nous avons cherché à déterminer, suivant notre modèle, l'action d'autres substances présentant une activité antiplasmine, l'inhibiteur de KUNITZ et l'acide Ɛ-aminocaproïque, étudiés suivant la même technique que l'inhibiteur de FREY : 1, 1,25 et 1,5 ml de la solution de l'inhibiteur dans 1 ml de sérum : l'ensemble est dilué au 1/10 dans du tampon de HAWKEY et l'on incorpore 0,1 ml de ce "sérum" artificiel dans le caillot standard, comme dans l'étude sur un sérum véritable. Un même sérum (n° 10), choisi au hasard, a servi de base à ces deux expérimentations. Nous appelons 10a, 10b, 10c le sérum auquel l'inhibiteur de FREY a été incorporé et 10d, 10e, 10f le sérum testé en présence d'acide Ɛ-aminocaproïque.

Tableau IV

Effet de l'inhibiteur de KUNITZ sur le temps de lyse

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 10'35"<br>10'25" | 16'<br>15'25" | 25'15"<br>25' | 37'<br>36'25" |
| 1/2 | 7'25"<br>7' | 8'15"<br>8'15" | 13'45"<br>13'25" | 21'<br>21' |

Sérum n° 10

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 14'25"<br>14'15" | 19'15"<br>18'25" | 25'<br>24' | 38'<br>37' |
| 1/2 | 9'25"<br>9' | 12'<br>12'15" | 15'15"<br>15' | 23'<br>23' |

Sérum n° 10a

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 22'<br>21'15" | 27'<br>26'25" | 33'25"<br>32'15" | 44'25<br>44' |
| 1/2 | 14'25"<br>14'20" | 19'15"<br>19' | 21'15"<br>21' | 27'<br>27'15" |

Sérum n° 10b

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 34'25"<br>34' | 39'<br>38'25" | 47'<br>46' | 55'<br>58' |
| 1/2 | 20'15"<br>20' | 29'<br>29'15" | 34'15"<br>34' | 40'<br>40' |

Sérum n° 10c

Tableau V

Effet de l'acide ε-aminocaproïque sur le temps de lyse

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 10'35"<br>10'25" | 16'<br>15'25" | 25'15"<br>25' | 37'<br>36'25" |
| 1/2 | 7'25"<br>7' | 8'15"<br>8'25" | 13'45"<br>13'25" | 21'<br>21' |

Sérum n° 10

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 16'<br>16'15" | 21'<br>20'25" | 29'15"<br>28' | 44'<br>42' |
| 1/2 | 11'15"<br>11' | 19'25"<br>18'15" | 22'<br>21'25" | 32'<br>31' |

Sérum n° 10d

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 23'15"<br>23' | 27'15"<br>27' | 33'25"<br>33' | 49'<br>45' |
| 1/2 | 19'25"<br>19'15" | 23'<br>22'25" | 34'<br>33'25" | 39'<br>36' |

Sérum n° 10e

| Plasmine / Sérum | 1/1 | 3/4 | 1/2 | 1/4 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 30'15"<br>30' | 35'<br>34'25" | 42'15"<br>42' | 54'<br>50' |
| 1/2 | 25'<br>24' | 29'<br>29' | 40'15"<br>39' | 49'25"<br>48' |

Sérum n° 10f

Nous avons obtenu, suivant notre méthode statistique, des résultats analogues à ceux déjà obtenus pour l'inhibiteur de FREY :

- diminution des antiplasmines immédiates (qui apparaissent négatives),
- diminution de la constante de vitesse de lyse,

mais avec ces deux inhibiteurs, on observe aussi une diminution de l'effet des antiplasmines progressives, de sorte que l'activité antiplasmine provient essentiellement de la réduction de la constante de vitesse $k_1$ (figures 15 et 16).

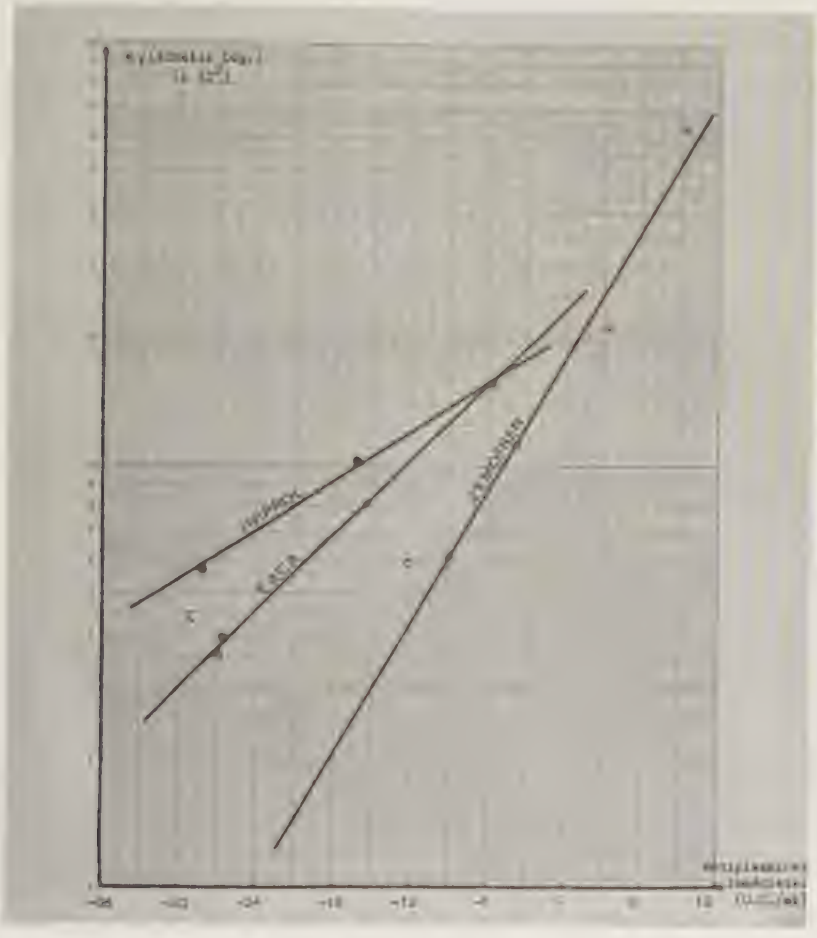


Figure 15

ANTIPLASMINES IMMEDIATES ET CONSTANTE DE VITESSE DE LYSE EN PRESENCE D'INHIBITEURS THERAPEUTIQUES

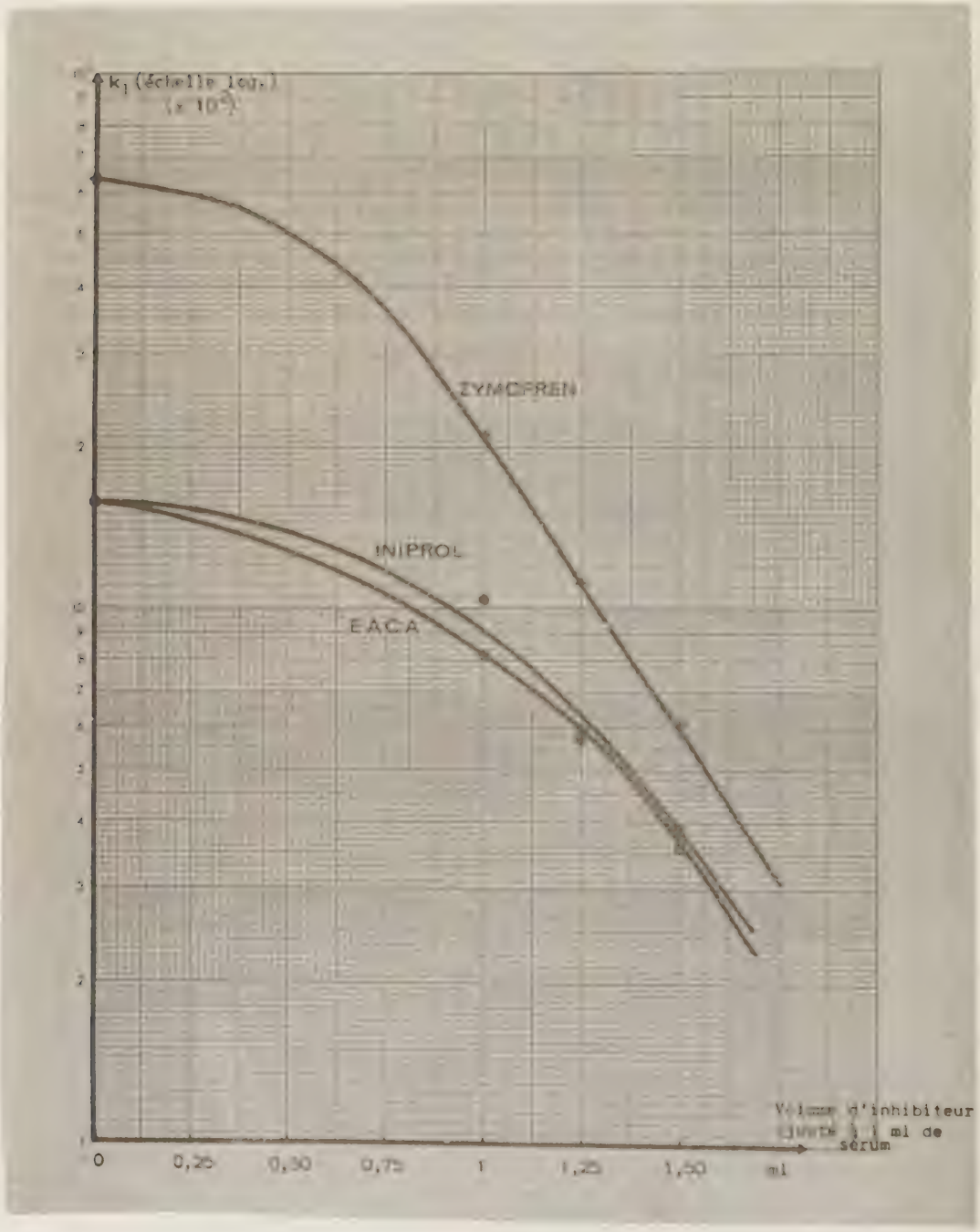



Figure 16

VARIATION DE LA CONSTANTE DE VITESSE DE LYSE EN PRESENCE D'INHIBITEURS THERAPEUTIQUES

Notons que le sérum utilisé était vraisemblablement un sérum anormal puisqu'il présentait, avant même toute adjonction d'inhibiteur, un taux négatif d'antiplasmines immédiates. De plus, nous remarquons que, dans des conditions non physiologiques, notre "test de vraisemblance" $a_1 a_2 \simeq a_3$ n'est plus vérifié, ce qui indique que notre schéma cinétique est sans doute insuffisant dès que l'on teste des sérums anormaux, ceci permettant peut-être de définir un critère de normalité.

Nous résumons nos résultats dans les tableaux VI et VII.

Tableau VI

Effet de l'inhibiteur de KUNITZ et de l'acide ε-amino-caproïque sur les paramètres de l'activité fibrinolytique d'un sérum

| Sérum n° | $a_1$ | $a_2$ | $a_3$ | $a_4$ |
|---|---|---|---|---|
| 10 | -0,309408 | 0,534306 | -0,034145 | 0,678018 |
| 10a | -0,867644 | 0,703324 | -0,047580 | 1,026840 |
| 10b | -1,492780 | 0,573642 | -0,152922 | 1,878180 |
| 10c | -1,417017 | 0,345122 | -0,120150 | 2,737054 |
| 10d | -0,823257 | 0,554930 | -0,038101 | 1,307624 |
| 10e | -0,65515 | 0,356693 | -0,028882 | 1,619684 |
| 10f | -1,438829 | 0,347587 | -0,126091 | 2,954997 |

Tableau VII

Paramètres fibrinolytiques d'un sérum en présence d'inhibiteurs

| Sérum n° | Plasmine immédiate (U.S./ml)* | Effet anti-plasmine progressif % plasmine restant après 10 mn | Temps d'inhibition de 50 % de la plasmine | $k_1$ (mg/mn x U.S.)* | |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 | + 5,81 | 34,5 | 6'30" | 0,157 | |
| 10a | 16,26 | 24,5 | 4'55" | 0,104 | Inhibiteur de KUNITZ |
| 10b | 28,08 | 32 | 6' | 0,057 | |
| 10c | 26,60 | 50 | 10' | 0,039 | |
| 10d | 15,45 | 33 | 6'15" | 0,082 | Acide ε-aminocaproïque |
| 10e | 12,30 | 49 | 9'45" | 0,059 | |
| 10f | 27 | 50 | 10' | 0,036 | |

*U.S. = Unité Sgouris

# APPLICATION DU MODELE CINETIQUE A LA FIBRINOFORMATION

Nous étendons le schéma cinétique que nous venons de développer au phénomène de coagulation du fibrinogène par la thrombine en présence de sérum. Désignons par $\Theta$ la concentration en thrombine dans le tube à hémolyse où se déroule la coagulation et par $\Phi$ la concentration en fibrinogène. Nous considérons, par analogie, que le sérum contient des antithrombines immédiates I et des antithrombines progressives X : nous partons d'hypothèses phénoménologiques semblables à celles qui ont guidé la formulation du modèle de la fibrinolyse, ce qui se traduit par les équations :

$$\Theta^* = \Theta - I$$

$$\frac{d\,\Theta^*}{dt} = - k_2 \, X \, \Theta^*$$

$$\frac{d\,\Phi}{dt} = - k_1 \, \Theta^*$$

Nous traduisons la formation de fibrine par l'équation décrivant la dégradation du fibrinogène par la thrombine, de façon à conserver une similitude formelle entre ce système et les équations de fibrinolyse. De ce fait, la résolution est identique et nous considérons que la formation du caillot visible s'est effectuée au moment T où $\Phi\,(T) = \alpha\,\Phi_o$, c'est-à-dire pour une augmentation donnée de la viscosité dans le tube à hémolyse, ce qui permet d'appliquer la formule précédemment trouvée :

$$T = - \frac{1}{k_2 \, X} \; \text{Log} \left[ 1 - \frac{\Phi_o \, (1-\alpha)}{k_1 \, \Theta_o^*} \; k_2 \, X \right]$$

L'étude statistique des résultats expérimentaux s'effectue, comme pour la fibrinolyse, en recherchant les coefficients de la régression multifactorielle :

$$\theta_o T = a_1 s T + a_2 \theta_o s T^2 - a_3 s^2 T^2 + a_4$$

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué la mesure du temps de coagulation, suivant la technique du caillot standard, mais en remplaçant la plasmine par 0,1 ml d'une thrombine dosée à 40 unités NIH par ml, à des dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, en présence de 0,1 ml de sérum dilué au 1/10 (tel quel ou dilué au demi). Cette étude a porté sur dix sérums dont certains effectués en double.

Temps de coagulation (en secondes)

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 30<br>29 | 36<br>35 | 48<br>47 | 115<br>110 |
| 1/2 | 34<br>33 | 41<br>40 | 54<br>56 | 127<br>125 |

Sérum A

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 45<br>43 | 52<br>50 | 57<br>60 | 100<br>106 |
| 1/2 | 49<br>49 | 57<br>55 | 59<br>62 | 120<br>118 |

Sérum B

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 20<br>20 | 35<br>34 | 40<br>41 | 90<br>91 |
| 1/2 | 21<br>22 | 38<br>37 | 46<br>45 | 99<br>101 |

Sérum C

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 29<br>28 | 35<br>34 | 48<br>48 | 120<br>115 |
| 1/2 | 35<br>34 | 42<br>42 | 55<br>57 | 127<br>128 |

Sérum D

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 21<br>21 | 30<br>29 | 35<br>34 | 91<br>92 |
| 1/2 | 26<br>27 | 33<br>32 | 42<br>41 | 124<br>127 |

Sérum E

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 43<br>42 | 50<br>49 | 47<br>46 | 110<br>108 |
| 1/2 | 47<br>46 | 55<br>56 | 60<br>61 | 119<br>118 |

Sérum F

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 23<br>22 | 33<br>32 | 40<br>41 | 101<br>100 |
| 1/2 | 27<br>27 | 40<br>41 | 52<br>51 | 108<br>107 |

Sérum G

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 25<br>24 | 30<br>29 | 39<br>40 | 100<br>105 |
| 1/2 | 29<br>30 | 39<br>38 | 43<br>44 | 112<br>115 |

Sérum H

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 21<br>20 | 31<br>30 | 37<br>36 | 91<br>90 |
| 1/2 | 27<br>28 | 32<br>31 | 40<br>41 | 118<br>118 |

Sérum I

| Thrombine / Sérum | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| 1/1 | 22<br>21 | 35<br>34 | 40<br>39 | 85<br>84 |
| 1/2 | 25<br>25 | 40<br>39 | 45<br>45 | 105<br>107 |

Sérum J

Les résultats de l'analyse statistique sont donnés par le tableau VIII (pour les calculs, l'unité de temps a été choisie égale à 100 secondes).

Tableau VIII

Application du modèle cinétique à la coagulation de dix sérums

| Sérum | $a_1$ | $a_2$ | $a_3$ | $-a_1a_2$ | $a_4$ |
|---|---|---|---|---|---|
| A | -0,784747 | 3,365333 | 0,206220 | 2, 64093 | 0,231453 |
| B | -1,085339 | 2,480103 | 0,525076 | 2, 69175 | 0,364454 |
| C | -0,704653 | 3,238380 | 0,272269 | 2, 28193 | 0,198531 |
| D | -0,762477 | 3,537679 | 0,153427 | 2,647399 | 0,221398 |
| E | -0,948436 | 3,632733 | 0,443148 | 3,445414 | 0,228869 |
| F | -1,121836 | 2,602955 | 0,515943 | 2,920089 | 0,363980 |
| G | -0,803287 | 3,549924 | 0,267266 | 2,851608 | 0,217204 |
| H | -0,773138 | 4,104801 | 0,180053 | 3,173577 | 0,192317 |
| I | -0,910534 | 4,117096 | 0,373651 | 3,748756 | 0,207808 |
| J | -0,886768 | 3,555414 | 0,444826 | 3,152827 | 0,222794 |

Les sérums A et D ainsi que E et I constituaient les doubles, ce que confirment les résultats, mais la similitude entre les sérums B et F est troublante, car ils correspondent à deux individus différents.

Deux conclusions sont immédiates à partir du tableau VIII :

- toutes les valeurs de $a_1$ sont négatives,
- le "test de vraisemblance" n'est jamais vérifié.

Cette situation est semblable à celle que nous avons rencontrée dans l'étude des inhibiteurs de FREY, de KUNITZ et de l'acide ε-aminocaproïque ; nous avions alors considéré que ces substances provoquaient la libération de plasmine à partir de complexes plasmine-antiplasmine (immédiate) présents sur la fibrine ou dans le sérum. Nous pouvons proposer une même interprétation, en considérant que la thrombine provoque la rupture de complexes thrombine-antithrombine (immédiate) provenant soit du sérum soit du fibrinogène, ou qu'elle active sa propre formation à partir de prothrombine apportée par le sérum. Ceci signifierait néanmoins que ce processus ne peut être décrit par l'une de nos équations :

$$\theta^* = \theta - I$$

$$\frac{d\,\theta^*}{dt} = - k_2 \, X \, \theta^*$$

En fait, il est vraisemblable que l'explication est beaucoup plus simple : le tableau montre l'importance des antithrombines progressives, qui apparaît dans les résultats trouvés pour $a_2$, et l'ordre de grandeur de ce paramètre (2,5 à 4) interdit d'effectuer un développement limité au second ordre dans la détermination de la fonction de régression, qui sert de base au calcul des inhibiteurs. En effet, nous écrivons

$$e^{- k_2 \, X \, t} = 1 - k_2 \, X \, t + 1/2 \, (k_2 \, X)^2 \, t^2$$

sans poursuivre ce développement ; nous trouvons pour

$a_2 = \frac{k_2 \, X}{2} = 2{,}50$ au minimum ; pour t = 100 secondes (t = 1 compte tenu de l'unité de temps choisie), ceci revient à écrire :

$$e^{-5} = 1 - 5 + \frac{25}{2} = 8{,}5$$

alors que $e^{-5} \simeq 6.10^{-3}$, ce qui constitue donc une erreur grossière.

REMARQUES

Cette étude cinétique de la fibrinolyse et de la fibrinoformation ne nous a pas permis de démontrer la symétrie entre ces deux phénomènes, qui était notre hypothèse initiale. Il est vraisemblable que cette symétrie, si elle existe formellement en ce qui concerne les substances qui entrent en jeu et certains mécanismes d'activation, ne peut se poursuivre jusqu'au niveau des valeurs des constantes de vitesse de réaction. C'est ainsi que notre modèle cinétique peut être établi, avec rigueur, de façon semblable pour les deux phénomènes, mais que la formule

$$T = -\frac{1}{k_2 X} \text{ Log } \left[ 1 - \frac{\Phi_o (1-\alpha)}{k_1 \theta_o^*} k_2 X \right]$$

pour la fibrinoformation ou

$$T = -\frac{1}{k_2 X} \text{ Log } \left[ 1 - \frac{F_o (1-\alpha)}{k_1 P_o^*} k_2 X \right]$$

pour la fibrinolyse, ne peut être appliquée avec succès dans les deux cas, compte tenu des artifices mathématiques naïfs mis en oeuvre : le terme $k_2 X$ est suffisamment faible, dans notre système fibrinolytique, pour justifier l'approximation employée alors qu'il n'en est rien dans la fibrinoformation.

La symétrie du schéma de KOLLER semble donc devoir être recherchée, non pas globalement comme nous l'avions souhaité, mais au niveau de chacune des réactions enzymatiques et peut-être l'étude des lipoprotéines

de la coagulation s'étendra-t-elle avec succès au niveau de la fibrinolyse et permettra-t-elle de compléter le schéma en cascade de MACFARLANE par une cascade symétrique, décrivant la fibrinolyse, mais dont seuls les derniers niveaux sont actuellement décrits (figure 17).

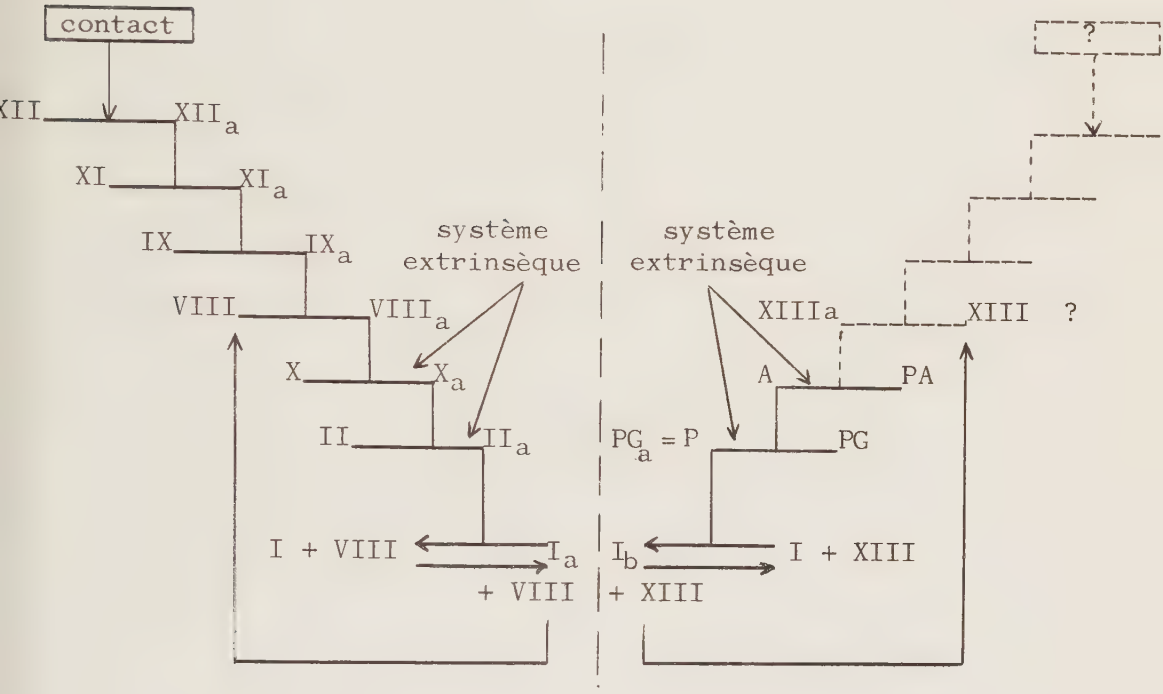



Figure 17

SCHEMA SYMETRIQUE EN CASCADE DE LA COAGULATION ET DE LA FIBRINOLYSE

# CONCLUSION

La fibrinoformation et la fibrinolyse sont deux phénomènes de finalités opposées, puisque l'un mène à la fibrine et que l'autre la détruit, mais de nombreux éléments incitent à les considérer comme deux aspects d'une même fonction et à les décrire de façon semblable.

Nous avons cherché à définir plus précisément la symétrie entre ces deux processus en les envisageant par le biais de la cinétique des réactions qui entrent en jeu. Cette étude nous a permis d'élaborer un modèle mathématique, qui ne permet pas de justifier la symétrie que nous cherchions mais qui fournit une méthode de détermination de paramètres importants du système fibrinolytique d'un individu. C'est ainsi que l'état fibrinolytique d'un sérum peut être caractérisé par la mesure des antiplasmines immédiates et progressives, ainsi que par la constante de vitesse de lyse d'un caillot de fibrine par la plasmine en présence de ce sérum.

Il paraît souhaitable de développer une telle technique de détermination des paramètres du système fibrinolytique, d'en définir les normes, et, compte tenu de la bonne reproductibilité de la méthode, d'envisager la mesure de ces variables lors d'enquêtes épidémiologiques sur l'athérosclérose, syndrome anatomoclinique dont la fibrinolyse est vraisemblablement un facteur significatif.

Vu : Le Président de Thèse

J. MONNIER

Vu et permis d'imprimer

Toulouse, le 20 mai 1970

Le Doyen

Président du Conseil Transitoire de Gestion

G. LAZORTHES

# B I B L I O G R A P H I E

On trouvera l'essentiel des références concernant ce sujet dans les ouvrages et thèses ci-après.

## 1. Livres

CAEN J., LARRIEU M.J. et SAMAMA M. - L'hémostase. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique.
Paris, Expansion Scientifique, 1968, 316 p.

FEARNLEY G.R. - Fibrinolysis.
London, Edward Arnold, 1965, 191 p.

HIEMEYER V. - Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse. [International Symposium von 29 Sept. bis 1 Okt. 1967 in Ulm (Donau)].
Stuttgart, Schattauer, 1969, 406 p.

JOHNSON S.A. and GUEST M.M. - Dynamics of thrombus formation and dissolution.
Philadelphia, Lippincott Company, 1969, 376 p.

JOHNSON S.A. and SEEGERS W.H. - Physiology of hemostasis and thrombosis.
Springfield, Thomas, 1967, 338 p.

KAULLA K.N. (von) - Chemistry of thrombolysis : human fibrinolytic enzymes.
Springfield, Thomas, 1963, 333 p.

RABY C. - Biologie des hémorragies et des thromboses.
Paris, Masson, 1966, 371 p.

RABY C. - Coagulations intravasculaires disséminées et localisées.
Paris, Masson, 1970, 199 p.

SALMON J. - Fibrinolyse et pathologie vasculaire.
Bruxelles, Arscia, 1964, 219 p.

SEEGERS W.H. - Blood clotting enzymology.
New York, Academic Press, 1967, 628 p.

TOCANTINS L.M. and KAZAL L.A. - Blood coagulation hemorrhage and thrombosis.
New York, Grune and Stratton, 1964, 532 p.

TRIA E. and SCANU A.M. - Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems.
London, Academic Press, 1969, 661 p.

## 2. Thèses

ALBUGUES M.J. - Contribution à l'étude des inhibiteurs sériques de la fibrinolyse.
Thèse Méd., Toulouse, 1968, 180 p.

COLINOT M. - Contribution à l'étude du pouvoir fibrinolytique du liquide amniotique.
Thèse Méd., Toulouse, 1967, 111 p.

MOURAD M. - Etude critique des techniques de détermination du fibrinogène, du plasminogène et de la fibrinolyse.
Thèse Pharm., Paris, 1964, 199 p.

SORIA J. - Contribution à l'étude de la physiopathologie de la fibrino-formation. Application particulière à l'exploration biologique d'une dysfibrinogénémie congénitale.
Thèse Pharm., Paris, 1968, 177 p.

WIRTH C. - Contribution à l'emploi de la thromboélastographie dans la mesure de l'activité fibrinolytique.
Thèse Pharm., Paris, 1968, 223 p.

Parmi les références consultées, nous ne citons que celles appelées dans le texte.

1. ABILDGAARD U. - N-terminal analysis during coagulation of purified human fibrinogen, fraction I and plasma.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1965, 17, 529-536.

2. ABILDGAARD U. - Purification of two progressive antithrombins of human plasma.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, 20, 207-216.

3. ABILDGAARD U. - Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc. electrophoresis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 21, 89-91.

4. ABILDGAARD U. - Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin in the absence of cofactor.
Scand. J. Haemat., 1968, 5, 432-439.

5. ABILDGAARD U. - Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin and purified cofactor.
Scand. J. Haemat., 1968, 5, 440-453.

6. ABILDGAARD U. - Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by $\alpha_2$-macroglobulin, studied by N-terminal analysis.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1969, 21, 173-180.

7. ABILDGAARD U. - Studies on the fibrinogen-fibrin conversion in human plasma.
Oslo, Universitetsforlaget, 1969, 24 p.

8. ALBRECHTSEN O.K. - The fibrinolytic activity of human tissues.
Brit. J. Haemat., 1957, 3, 284-291.

9. ALKJAERSIG N., FLETCHER A.P. and SHERRY S. - The activation of human plasminogen. II - A kinetic study of activation with trypsin, urokinase and streptokinase.
J. Biol. Chem., 1958, 233, 86-90.

10. ALLINGTON M.J. - Fibrin substrate free from both plasminogen and fibrin stabilizing factor.
Nature, 1968, 217, 375-376.

11. AMBRUS C.M. and MARKUS G. - Plasmin-antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic enzyme.
Amer. J. Physiol., 1960, 199, 491-494.

12. ASTRUP T. - Fibrinolysis in the organism.
Blood, 1956, 11, 781-806.

13. ASTRUP T., HENRICHSEN J., PANDOLFI M. and TYMPANIDIS K. - Fibrinolytic activity as exhibited by different types of cells.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18, 297-298.

14. BANG N.U. - Ultrastructure of the fibrin clot.
In : SEEGERS W.H. - "Blood Clotting Enzymology".
New York, Academic Press, 1967, pp. 487-549.

15. BANG N.U., FLETCHER P., ALKJAERSIG N. and SHERRY S. - Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic (fibrinolytic) states. III - Demonstration of abnormal clot structure by electron microscopy.
J. Clin. Invest., 1962, 41, 935-948.

16. BARLOW G.H., SUMMARIA L. and ROBBINS K.C. - Molecular weight studies on human plasminogen and plasmin at the microgram level.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 1138-1141.

17. BARNHART M.I. and CRESS D.C. - Plasma clearance of products of fibrinolysis.
In : DI LUZIO N.R. and PAOLETTI R. - "The reticuloendothelial system and atherosclerosis".
New York, Plenum Press, 1967, vol. 1, pp. 492-502.

18. BARNHART M.I. and RIDDLE J.M. - Cellular localization of profibrinolysin (plasminogen).
Blood, 1963, 21, 306-321.

19. BARTON P.G. - Lipoproteins of blood coagulation.
In : TRIA E. and SCANU A.M. - "Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems".
London, Academic Press, 1969, pp. 465-515.

20. BELITSER V.A., VARETSKAJA T.V. and MALNEVA G.V. - Fibrinogen-fibrin interaction.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 154, 367-375.

21. BERG W. - Plasminogen and urokinase determination based on the lysis time method.
Acta Med. Scand., 1967, Supplt 478, 43 p.

22. BERG W., KORSAN-BENGTSEN K. and YGGE J. - Theoretical basis and standardization of the one-stage lysis time method for determination of urokinase.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, 169-177.

23. BILINSKI T., LOCH T. and ZAKRZEWSKI K. - Studies on streptokinase : purification and some molecular properties.
Acta Biochim. Pol., 1968, 15, 123-128.

24. BLOMBACK B. - The N-terminal disulphide knot of human fibrinogen.
Brit. J. Haemat., 1969, 17, 145-157.

25. BLOMBACK B., BLOMBACK M., EDMAN P. and HESSEL B. - Human fibrinopeptides : isolation, characterization and structure.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 115, 371-396.

26. BLOMBACK B., BLOMBACK M., HENSCHEN A., HESSEL B., IWANAGA S. and WOODS K.R. - N-terminal disulphide knot of human fibrinogen.
Nature, 1968, 218, 130-134.

27. BLOMBACK M., BLOMBACK B., MAMMEN E.F. and PRASAD - Fibrinogen Detroit. A molecular defect in the N-terminal disulphide knot of human fibrinogen ?
Nature, 1968, 218, 134-137.

28. BOISSEZON J.F. (de) - Communication personnelle.

29. BRUCE S. - The effect of calcium on fibrinolysis in vitro.
J. Clin. Path., 1964, 17, 282-286.

30. BUCK F.R., HUMMEL B.C.W. and RENZO E.C. (de) - Interaction of streptokinase and human plasminogen. V - Studies on the nature and mechanism of formation of the enzymatic site of the activator complex.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3648-3654.

31. BURSTEIN M. et LOEB J. - Inhibition de la thrombinoformation par l'héparine. Le cofacteur plasmatique de l'héparine est-il l'antithrombine ?
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1956, 1, 752-758.

32. CATT K.J., HIRSH J., CASTELAN D.J., NIALL H.D. and TREGEAR G.W. - Radioimmunoassay of fibrinogen and its proteolysis products.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 20, 1-6.

33. CELANDER D.R. and GUEST M.M. - The biochemistry and physiology of urokinase.
Amer. J. Cardiol., 1960, 6, 409-419.

34. CHANDRASEKHAR N., WARREN L., OSBAHR A.J. and LAKI K. - Role of sialic acid in fibrinogen.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 337-339.

35. CHEN R., and DOOLITTLE R.F. - Identification of the polypeptide chains involved in the cross-linking of fibrin.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1969, 63, 420-427.

36. CHRISTENSEN L.R. and McLEOD C.M. - A proteolytic enzyme of serum : characterization, activation and reaction with inhibitors.
J. Gen. Physiol., 1945, 28, 559-583.

37. CUDDIGAN B.J. and KAY D. - The fine structure of platelet fibrin.
Brit. J. Haemat., 1968, 15, 177-179.

38. DAS P.C., ALLAN A.G., WOODFIELD D.G. - Fibrin degradation products in sera of normal subjects.
Brit. Med. J., 1967, 4, 718-720.

39. DASTRE A. - Fibrinolyse dans le sang.
Arch. Physiol. Norm. Path., 1893, 25, 661-663.

40. DAVER J., ALBUGUES M.J., DU PASQUIER J.P. and RICOEUR M. - The determination of serum fibrinolytic inhibitors in normal practice.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1969, 22, 110-120.

41. DAVER J., ALBUGUES M.J., DU PASQUIER J.P. et RICOEUR M. - Remarques d'actualité sur une représentation mathématique de la cinétique de la fibrinolyse.
Coagulation, 1969, 2, 351-359.

42. DAVER J., ALBUGUES M.J., QUERITET A. et MESSERLI P. - Le système inhibiteur de la fibrinolyse.
Rev. Méd. Toulouse, 1970, 6, 157-166.

43. DAVER J., EDMOND E., PANAK E. et RICOEUR M. - Fibrinolyse : cinétique de la lyse du caillot de fibrine.
Rev. Europ. Etud. Clin. Biol., 1970, 15, 333-342.

44. DOLESCHEL W. and AUERSWALD W. - Gel filtration studies of the complex forming capacity of streptokinase with human and heterologous plasminogens.
Med. Pharmacol. Exp., 1967, 17, 248-254.

45. DONNER L. and HOUSKOVA J. - On the action mechanism of some fibrinolysis inhibitors.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18, 439-446.

46. DUDOK DE WIT C. - Investigations on the inhibitors of the fibrinolytic system.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1964, 12, 105-118.

47. DUPONT C. - L'acide epsilon-amino-caproïque.
Prod. Probl. Pharm., 1965, 20, 581-590.

48. EGEBERG O. - Inhibited antithrombin deficiency causing thrombophilia.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1965, 13, 516-529.

49. EHRENPREIS S. and SHERAGA H. - Kinetics of the conversion of fibrinogen to fibrin monomer at neutral pH.
Arch. Biochem., 1959, 79, 27-43.

50. ENGEL A., ALEXANDER B., and PECHET L. - Activation of trypsinogen and plasminogen by thrombin preparations.
Biochemistry, 1966, 5, 1543-1551.

51. FEARNLEY G.R. - Fibrinolysis.
London, Edward Arnold, 1965, 191 p.

52. FLETCHER A., ALKJAERSIG N., FISHER S. and SHERRY S. - The proteolysis of fibrinogen by plasmin ; the identification of thrombin-clottable fibrinogen derivatives which polymerize abnormally.
J. Lab. Clin. Med., 1966, 68, 780-802.

52. GALLIMORE M.J. and SHAW J.T.B. - Some aspects of fibrin clot lysis and bis its inhibition by human serum.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18, 101-113.

53. GANROT P.O. - Separation of two trypsin-binding $\alpha_2$-globulins of human serum.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 597-601.

54. GANROT P.O. - Inhibition of plasmin activity by $\alpha_2$-macroglobulin.
Clin. Chim. Acta, 1967, 16, 328-330.

55. GANROT P.O. - On the determination of molar concentration of plasmin and plasmin inhibitors.
Acta Chem. Scand., 1967, 21, 595-601.

56. GANROT P.O. - Electrophoretic separation of two thrombin inhibitors in plasma and serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1969, 24, 11-14.

57. GARNER R.L. and TILLET W.S. - Biochemical studies on the fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. II - Nature of the reaction.
J. Exp. Med., 1934, 60, 255-267.

58. GODAL H.C. - The influence of heparin on the fibrin clot.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13, 306-313.

59. GODAL H.C. - An inhibitor to fibrin stabilizing factor (F.S.F., Factor XIII).
Scand. J. Haemat., 1970, 7, 43-48.

60. GORMSEN J. and LAURSEN B. - Fibrinogen break-down products and clotting parameters.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 17, 467-481.

61. GUTMAN M. and RIMON A. - Studies on the activation of plasminogen. II - On the nature of the proactivator.
Canad. J. Biochem., 1964, 42, 1339-1345.

62. HARMISSON C.R. and MAMMEN E.F. - Molecular characteristics of substances active in blood coagulation.
In : SEEGERS W.H. - "Blood Clotting Enzymology".
New York, Academic Press, 1967, pp. 23-101.

63. HAWKEY C.M. and STAFFORD J.L. - A standard clot method for the assay of plasminogen activators, anti-activators and plasmin.
J. Clin. Path., 1964, 17, 175-181.

64. HEDNER U. and NILSSON I.M. - Determination of plasminogen in clots and thrombi.
In : HIEMEYER V. - "Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse".
/International Symposium von 29 Sept. bis 1 Okt. 1967 in Ulm (Donau)/.
Stuttgart, Schattauer, 1969, pp. 193-198.

65. HEMKER H.C. and MULLER A.D. - Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes. V - The reaction mechanism of the extrinsic clotting system as revealed by the kinetics of one-stage estimations of coagulation enzymes.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, 368-382.

66. HENSTELL H.H. and KLIGERMANN M. - The nature of heparin antithrombin action.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18, 167-178.

67. HIRSH H., FLETCHER A.P. and SHERRY S. - Effect of fibrin and fibrinogen proteolysis products on clot physical properties.
Amer. J. Physiol., 1965, 209, 415-424.

68. IONESCO-STOIAN F. and ISTRATI M. - Contributions to the study of plasminogen. III - High purification of human plasminogen.
Vox Sang., 1968, 14, 428-437.

69. JOSSO F. et FAURE A. - La transformation du fibrinogène en fibrine. II - Polymérisation de la fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1965, 5, 316-323.

70. KAULLA K.N. (von) - Chemistry of thrombolysis : human fibrinolytic enzymes.
Springfield, Thomas, 1963, 333 p.

71. KAWANO T., MORIMOTO K. and UEMURA Y. - Urokinase inhibitor in human placenta.
Nature, 1968, 217, 253-254.

72. KOK P. and ASTRUP T. - Isolation and purification of a tissue plasminogen activator and its comparison with urokinase.
Biochemistry, 1969, 8, 79-86.

73. KOLLER F. - The development of our knowledge of fibrinolysis.
Amer. J. Cardiol., 1960, 6, 367-370.

74. KOPEC M., LATALLO Z.S., STAHL M. and WEGRZYNOWICZ Z. - The effect of proteolytic enzymes on fibrin stabilizing factor.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, 437-445.

75. KUCINSKI S., FLETCHER A.P. and SHERRY S. - Effect of urokinase antiserum on plasminogen activators : demonstration of immunologic dissimilarity between plasma plasminogen activator and urokinase.
J. Clin. Invest., 1968, 47, 1238-1253.

76. LARRIEU M.J., INCEMAN S. et MARDER V.J. - Action des produits de dégradation du fibrinogène sur les fonctions plaquettaires.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1967, 7, 691-704.

77. LARRIEU M.J., MARDER V.J. and INCEMAN S. - Effects of fibrinogen degradation products on platelets and coagulation.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1966, 20, 215-226.

78. LASSEN M. - Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method.
Acta Physiol. Scand., 1952, 27, 371-376.

79. LATALLO Z.S., BUDZINSKI A.Z., LIPINSKI B. and KOWALSKI E. - Inhibition of thrombin and of fibrin polymerization, two activities derived from plasmin-digested fibrinogen.
Nature, 1964, 203, 1184-1185.

80. LATALLO Z.S., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N. and SHERRY S. - Influence of pH, ionic strength, neutral ions and thrombin on fibrin polymerization.
Amer. J. Physiol., 1962, 202, 675-680.

81. LATALLO Z.S., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N. and SHERRY S. - Inhibition of fibrin polymerization by fibrinogen proteolysis products.
Amer. J. Physiol., 1962, 202, 681-686.

82. LESUK A., TERMINIELLO L., TRAVER J.H. and GROFF J.L. - Biochemical and biophysical studies of human urokinase.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18, 293-294.

83. LEWIS J.H. and WILSON J.H. - Fibrinogen breakdown products.
Amer. J. Physiol., 1964, 207, 1053-1057.

84. LINIGER W. and RUEGSEGGER P. - A mathematical model of fibrinolysis.
Math. Biosci., 1967, 1, 263-285.

85. LIPINSKI B. and WOROWSKI K. - Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 20, 44-49.

86. LOCH T., BILINSKI T. and ZAKRZEWSKI K. - Studies on streptokinase : the conformation.
Acta Biochim. Pol., 1968, 15, 129-136.

87. LORAND L. - Fibrinogen and its reaction in clotting.
In : JOHNSON S.A. and GUEST M.M. - "Dynamics of thrombus formation and dissolution".
Philadelphia, Lippincott Company, 1969, pp. 212-244.

88. LORAND L. and JACOBSEN A. - Studies on the polymerization of fibrin. The role of the globulin fibrin stabilizing factor.
J. Biol. Chem., 1958, 230, 421-434.

89. LORAND L. and JACOBSEN A. - Specific inhibitors and the chemistry of fibrin polymerization.
Biochemistry, 1964, 3, 1939-1943.

90. LORAND L., JACOBSEN A. and BRUNER-LORAND J. - A pathological inhibitor of fibrin cross-linking.
J. Clin. Invest., 1968, 47, 268-273.

91. LORAND L. and KONISHI K. - Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin.
Arch. Biochem., 1964, 105, 58-67.

92. MACFARLANE R.G. - Fibrinolysis following operation.
Lancet, 1937, 1, 10-12.

93. McKEE P.A., ROGERS L.A., MARLER E. and HILL R.L. - The subunit polypeptides of human fibrinogen.
Arch. Biochem., 1966, 116, 271-279.

94. McNICOL G.P., WILSON P.A. and DOUGLAS A.S. - The influence of fibrinogen breakdown products on the aggregation of platelets.
In : HIEMEYER V. - "Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse". /International Symposium von 29 Sept. bis 1 Okt. 1967 in Ulm (Donau)7. Stuttgart, Schattauer, 1969, pp. 169-170.

95. MENACHE D. - La transformation du fibrinogène en fibrine. I - Action de la thrombine sur le fibrinogène.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1965, 5, 309-315.

96. MERRILLS R.J. and SHAW J.T.B. - Kinetics of fibrin clot lysis.
Biochem. J., 1968, 106, 101.

97. MESTER L. - Structure et rôle des fractions glucidiques des glycoprotéines impliquées dans la coagulation du sang.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 635-648.

98. MESTER L., MOCZAR E., VASS G. et SZABADOS L. - Structure et rôle des fractions glucidiques du fibrinogène.
Path. Biol., 1965, 13, 540-545.

99. MESTER L. et SZABADOS L. - Différences constitutionnelles et fonctionnelles entre les fragments glucidiques du fibrinogène humain normal et d'un fibrinogène humain anormal.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2561-2566.

100. MESZAROS M. - Amino acid sequence of fibrin glycopeptides.
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1968, 3, 421-423.

101. MILLER S.P. and SANCHEZ-AVALOS J. - Degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes. II - Effects of the products on coagulation.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 20, 15-30.

102. MONKHOUSE F.C., FRANCE E.S. and SEEGERS W.H. - Studies on the antithrombin and heparin-cofactor activities of a fraction adsorbed from human plasma by aluminium hydroxyde.
Circ. Res., 1955, 3, 397-402.

103. MORGAN F.J. and HENSCHEN A. - The structure of streptokinase. I - Cyanogen bromide fragmentation, amino acid composition and partial amino acid sequences.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, 93-104.

104. MULLERTZ S. and LASSEN M. - An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 82, 264-268.

105. MURAMATU M., HAYAKUMO Y., ONISHI T., SATO T. and FUJII S. - Comparison of human plasmins formed by activation with trace and large amounts of streptokinase.
J. Biochem., 1969, 65, 329-342.

106. NANNINGA L.B. and GUEST M.M. - Preparation and properties of anti-coagulant split product of fibrinogen and its determination in plasma.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 17, 440-451.

107. NANNINGA L.B. and GUEST M.M. - Antifibrinolytic action of the anti-coagulant split product of fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, 528-532.

108. NIEWIAROWSKI S. et KOWALSKI E. - Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène.
Rev. Hémat., 1958, 13, 320-328.

109. NILSSON I.M., ANDERSSON L. and BJORKMAN S.E. - Epsilon-aminocaproic acid (EACA) as a therapeutic agent. Based on 5 years' clinical experience.
Acta Med. Scand., 1966, Supplt 448, 38 p.

110. NILSSON I.M. and KULLANDER S. - Coagulation and fibrinolytic studies during pregnancy.
Acta Obstet. Gynec. Scand., 1967, 46, 273-284.

111. NORMAN P.S. - Antiplasmins.
Fed. Proc., 1966, 25, 63-67.

112. NUSSENZWEIG V., SELIGMANN M. et GRABAR P. - Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. II - Etude immunologique : mise en évidence d'anticorps antifibrinogène natif possédant des spécificités différentes.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, 490-508.

113. NUSSENZWEIG V., SELIGMANN M., PELMONT J. et GRABAR P. - Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. I - Séparation et propriétés physico-chimiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, 377-389.

114. OGSTON D., OGSTON C.M. and FULLERTON H.W. - The plasminogen content of thrombi.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1966, 15, 220-230.

115. OKAMOTO S. and OKAMOTO U. - Amino-methyl-cyclohexane-carboxylic acid : AMCHA.
Keio J. Med., 1962, 11, 105-115.

116. OKAMOTO S., OSHIBA S., MIHARA H. and OKAMOTO U. - Synthetic inhibitors of fibrinolysis : in vitro and in vivo mode of action.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1968, 146, 414-429.

117. OSHIBA S., HATA S. and OKAMOTO S. - A plasminogen activator in mammalian bile.
Jap. J. Physiol., 1969, 19, 212-219.

118. PECHET L. - Fibrinolysis.
New Eng. J. Med., 1965, 273, 966-973.

119. PILGERAM L.O. - Turnover rate of autologous plasma fibrinogen - $^{14}C$ in subjects with coronary thrombosis.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 20, 31-43.

120. PLOUG J. and KJELDGAARD N.O. - Urokinase, an activator of plasminogen from human urine. I - Isolation and properties.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 278-282.

121. PLOUG J. and KJELDGAARD N.O. - Urokinase, an activator of plasminogen from human urine. II - Mechanism of plasminogen activation.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 283-288.

122. PROKOPOWICZ J. - Distribution of fibrinolytic and proteolytic enzymes in subcellular fractions of human granulocytes.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, 84-93.

123. PROKOPOWICZ J. - Purification of plasminogen from human granulocytes using DEAE-Sephadex column chromatography.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 154, 91-95.

124. PROKOPOWICZ J.,and NIEWIAROWSKI S. - Comparative studies on the properties of human plasma and granulocyte plasminogen.
Bull. Acad. Pol. Sci., 1968, 16, 261-265.

125. PROKOPOWICZ J. and STORMORKEN H. - Fibrinolytic activity of leucocytes in smears of bone marrow and peripheral blood.
Scand. J. Haemat., 1968, 5, 129-137.

126. QUICK A.J. - The normal antithrombin of the blood and its relation to heparin.
Amer. J. Physiol., 1938, 123, 712-719.

127. RABY C. et BERTRAND H. - Dextran et coagulation dynamique.
Presse Med., 1969, 77, 1819-1820.

128. RIFE U., MILGROM F. and SHULMAN S. - Antigenic analysis of plasminogen and plasmin.
Blood, 1963, 21, 322-334.

129. RIMON A., SHAMASH Y. and SHAPIRO B. - The plasmin inhibitor of human plasma. IV - Its action on plasmin, trypsin, chymotrypsin and thrombin.
J. Biol. Chem., 1966, 241, 5102-5107.

130. ROBBINS K.C. and SUMMARIA L. - Purification of human plasminogen and plasmin by gel filtration on sephadex and chromatography on diethylaminoethyl-sephadex.
J. Biol. Chem., 1963, 238, 952-962.

131. SALMON J. - Etude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés.
Clin. Chim. Acta, 1969, 4, 767-775.

132. SANCHEZ-AVALOS J. and MILLER S.P. - Degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes. I - Characterization and isolation of products and their relation to fibrinolytic states.
Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, 499-515.

133. SCHULTZ R.L. and KAULLA K.N. (von) - The effect of urokinase and fibrinolytic euglobulins on synthetic amino acid esters.
Biochem. J., 1958, 68, 218-221.

134. SCHULTZ R.L., MOORMAN J.A., MATOUSH L.O. and LINCOLN A.F. - Evaluation of synthetic substrate methods for clinical determination of fibrinolysis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 198-201.

135. SCHWICK H.G. und HEIMBURGER N. - Biochemie der Fibrinolyse.
In : HIEMEYER V. - "Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse". (International Symposium von 29 Sept. bis 1 Okt. 1967 in Ulm (Donau)).
Stuttgart, Schattauer, 1969, pp. 9-25.

136. SEEGERS W.H. - Blood clotting mechanisms : three basic reactions.
Ann. Rev. Physiol., 1969, 31, 269-294.

137. SEEGERS W.H., McCOY L., KIPFER R.K. and MURANO G. - Preparation and properties of thrombin.
Arch. Biochem., 1968, 128, 194-201.

138. SEEGERS W.H., NIEFT M.L. and VANDENBELT J.M. - Decomposition products of fibrinogen and fibrin.
Arch. Biochem., 1945, 7, 15-19.

139. SEMAR M., SKOZA L. and JOHNSON A.J. - Partial purification and properties of a plasminogen activator from human erythrocytes.
J. Clin. Invest., 1969, 48, 1777-1785.

140. SHIMIZU M., AOYAGI T., IWAMOTO M., ABIKO Y., NAITO T. and OKANO A. - Medicinal chemical studies on antiplasmin drugs. I - Establishment of the screening assay method for antiplasmin drugs and the superiority of trans-4-amino-methylcyclohexane-carboxylic acid (Tranexamic Acid) to cis-form.
Chem. Pharm. Bull., 1968, 16, 357-363.

141. SHULMAN S., ALKJAERSIG N. and SHERRY S. - Physicochemical studies on human plasminogen (profibrinolysin) and plasmin (fibrinolysin).
J. Biol. Chem., 1958, 233, 91-97.

142. SORIA J. - Contribution à l'étude de la physiopathologie de la fibrinoformation. Application particulière à l'exploration biologique d'une dysfibrinogénémie congénitale.
Thèse Pharm., Paris, 1968, 177 p.

143. SOULIER J.P. - L'action enzymatique de la thrombine sur le fibrinogène.
Ann. Biol. Clin., 1964, 22, 325-340.

144. STEINBUCH M. et BLATRIX C. - Action anti-protéasique de l'$\alpha_2$-macroglobuline. I - Activités antiplasmine et antitrypsine.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1968, 13, 142-152.

145. STEINBUCH M., BLATRIX C. and JOSSO F. - Alpha$_2$-macroglobulin as progressive antithrombine.
Nature, 1967, 216, 500-501.

146. STEINBUCH M., BLATRIX C. et JOSSO F. - Action anti-protéasique de l'$\alpha_2$-macroglobuline. II - Son rôle d'antithrombine progressive.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1968, 13, 179-186.

147. SUMMARIA L., HSIEH B., GROSKOPF W.R. and ROBBINS K.C. - Direct activation of human plasminogen by streptokinase.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 130, 737-743.

148. SUMMARIA L., LING C.M., GROSKOPF W.R. and ROBBINS K.C. - The active site of bovine plasminogen activator. Interaction of streptokinase with human plasminogen and plasmin.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 144-150.

149. TAYLOR F.B. Jr and BOTTS J. - Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen.
Biochemistry, 1968, 7, 232-242.

150. TEGER-NILSSON A.C. - Degradation of human fibrinopeptides A and B in blood serum in vitro.
Acta Chem. Scand, 1968, 22, 3171-3182.

151. THORSEN S. and ASTRUP T. - Biphasic inhibition of urokinase-induced fibrinolysis by E-aminocaproic acid ; distinction from tissue plasminogen activator.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 130, 811-813.

152. TRIANTAPHYLLOPOULOS E. and TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C. - New anticoagulant from lysed fibrinogen.
Brit. J. Haemat., 1967, 13, 28-41.

153. TRIANTAPHYLLOPOULOS E. and TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C. - Picric acid soluble fragments liberated from fibrinogen by fibrinolysin.
Life Sci., 1968, 7, 431-441.

154. TRIANTAPHYLLOPOULOS E. and TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C. - Fibrinogenolysis : the micromolecular derivatives.
Brit. J. Haemat., 1968, 15, 337-343.

155. IS'AO C.H. and KLINE D.L. - Plasminogen activator formed by reaction of streptokinase with human plasminogen.
J. Appl. Physiol., 1969, 26, 634-639.

156. VERMYLEN C. et VERSTRAETE M. - Différenciation des inhibiteurs de la conversion du fibrinogène en fibrine.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1965, 5, 376-382.

157. VERSTRAETE M. et VERMYLEN C. - Recherche sur l'antithrombine V dans la maladie de Kahler.
Acta Haemat., 1959, 22, 240-254.

158. WALSH P.N., STENGLE J.M. and SHERRY S. - The urokinase pulmonary embolism trial.
Circulation, 1969, 39, 153-156.

159. WOLOSOWICZ N., JAROSZEWICZ L. et NIEWIAROWSKI S. - (The biochemistry of fibrinolytic system of blood serum). En Polonais.
Postepy Biochem., 1968, 14, 3-25.

160. YOKOI M. - Studies on specific inhibitors to the plasmin system and their physiological action : the inhibitory effect of aminoacids and their derivatives.
J. Physiol. Soc. Jap., 1960, 22, 1098-1103.

# TABLE DES MATIERES


INTRODUCTION ..... 1

CHAPITRE I - FIBRINOFORMATION ..... 5

HISTORIQUE ..... 7

FIBRINOGENE ..... 11

. Origine et localisation ..... 13

. Propriétés physico-chimiques ..... 14

. Constitution ..... 16

TRANSFORMATION DU FIBRINOGENE EN FIBRINE.. 21

. Thrombine ..... 23

. Action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène ..... 25

. Polymérisation des monomères de fibrine ..... 32

. Activateurs et inhibiteurs ..... 37

CHAPITRE II - FIBRINOLYSE ..... 43

HISTORIQUE ..... 45

. La "fibrinolyse post-mortem" ..... 47

. L'auto-digestibilité de la fibrine ..... 48

. La "fibrinolyse streptococcique" ..... 49

FACTEURS DE LA FIBRINOLYSE ..... 51

. Le système plasminogène-plasmine ..... 53

. Activateurs, inhibiteurs ..... 55

DYNAMIQUE DU SYSTEME FIBRINOLYTIQUE ..... 63

. Activation du plasminogène en plasmine.. 65

. Fibrinolyse et fibrinogénolyse ..... 68

. Mécanisme physiologique de la fibrinolyse..... 72

CHAPITRE III - ETUDE CINETIQUE ..... 77

METHODES D'ETUDE DE LA FIBRINOLYSE ..... 79

. Cinétique de la lyse du caillot standard ..... 83

MODELE MATHEMATIQUE ..... 87

. Formulation du modèle ..... 89

. Application aux données expérimentales ..... 92

. Détermination des inhibiteurs sériques ..... 98

APPLICATION DU MODELE CINETIQUE A LA FIBRINOFORMATION ..... 119

. Remarques ..... 126

CONCLUSION ..... 129

BIBLIOGRAPHIE ..... 133